

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



CONTROL DE LA SALIDA DE MITOSIS EN MAMÍFEROS

**TESIS DOCTORAL**

EUSEBIO MANCHADO ROBLES

Madrid, 2011



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Control de la salida de mitosis en mamíferos**

Eusebio Manchado Robles

Licenciado en Farmacia

Director: Marcos Malumbres Martínez

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Madrid, 2011





Marcos Malumbres Martínez, Jefe del Grupo de División Celular y Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Certifica: que **Eusebio Manchado Robles** ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado:

### **Control de la salida de mitosis en mamíferos**

Revisado el presente trabajo, considera que reúne todos los méritos necesarios para su presentación y defensa con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Marcos Malumbres Martínez



A mis padres, a mi hermana y a María





Resumen/Summary



## Resumen

La salida de mitosis ha sido propuesta recientemente como una importante estrategia en la terapia frente al cáncer. Mediante el uso de ratones modificados genéticamente, hemos podido comprobar que el cofactor mitótico del complejo APC/C, Cdc20, es esencial para el inicio de la anafase tanto en células embrionarias o adultas, como en células progenitoras. Mientras las actuales drogas antimitóticas muestran un efecto limitado en tumores agresivos, la ablación genética de Cdc20 resulta en la regresión tumoral completa. Aun así, las células deficientes para Cdc20 experimentan una eficaz salida de mitosis tras la inhibición concomitante de las quinasas Cdk1 y Mastl (Greatwall). Esta salida de mitosis es dependiente de la actividad fosfatasa de los complejos PP2A-B55 $\alpha$ , $\delta$ . Nuestros resultados revelan a los reguladores críticos de la salida de mitosis en células de mamíferos y aportan claves inequívocas sobre el balance que existe entre la muerte celular en mitosis y la salida de esta fase.

## Summary

Targeting mitotic exit has been recently proposed as a relevant therapeutic approach against cancer. By using genetically engineered mice we show that the APC/C cofactor Cdc20 is essential for anaphase onset in vivo in embryonic or adult cells, including progenitors/stem cells. Ablation of Cdc20 results in efficient regression of aggressive tumors whereas current mitotic drugs display limited effects. Yet, Cdc20-null cells can exit upon concomitant inactivation of Cdk1 and the kinase Mastl (Greatwall). This mitotic exit depends on the activity of PP2A phosphatase complexes containing B55 $\alpha$  or B55 $\delta$  regulatory subunits. These data reveal critical players of mitotic exit in mammals and provide new avenues for manipulating the balance between apoptotic cell death and mitotic exit in tumor cells.



## Índice

Índice.....	1
Abreviaturas.....	5
<b>Introducción.....</b>	<b>11</b>
1. El ciclo celular.....	12
1.1. Componentes del sistema de control del ciclo celular.....	13
1.1.1. Quinasas dependientes de ciclina.....	14
1.1.2. Regulación transcripcional del ciclo celular.....	16
1.1.3. Control del ciclo celular mediante proteólisis cíclica.....	16
2. La mitosis.....	17
2.1. Bases moleculares de la entrada y progresión en mitosis.....	18
2.2. Bases moleculares de la salida de mitosis.....	21
2.2.1. El complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C).....	22
2.2.1.1. APC/C-Cdc20 y el punto de control de unión al huso.....	23
2.2.2. La desfosforilación como regulador de salida de mitosis.....	26
3. El cáncer como enfermedad del ciclo celular.....	27
3.1. Dianas en la terapia antineoplásica: la mitosis.....	29
<b>Objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>37</b>
1. Ratones modificados genéticamente.....	37
1.1. Generación del vector knock-out condicional para Cdc20.....	37
1.2. Generación de las quimeras mutantes para Cdc20.....	37
1.3. Análisis de genotipo de los ratones modificados genéticamente.....	38
1.4. Tratamientos y procedimientos realizados en los ratones.....	38
1.4.1. Tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT).....	38
1.4.2. Tratamiento carcinogénico con DMBA/TPA.....	39
1.4.3. Inducción de la proliferación en células progenitoras del folículo piloso.....	39
1.4.4. Tratamiento con drogas antimitóticas.....	39
1.5. Análisis histológico e inmunohistoquímico.....	40

2. Embriones.....	40
2.1. Inmunofluorescencia de embriones.....	41
3. Cultivos celulares.....	41
3.1. Infecciones y ensayos con RNA de interferencia.....	42
3.2. Citometría de flujo.....	42
3.3. Transformación celular por oncogenes y videomicroscopía.....	43
4. Procedimientos bioquímicos.....	43
4.1. Westerns blot, inmunoprecipitación y ensayos de actividad quinasa.....	43
4.2. Extendido cromosómico.....	44
4.3. Inmunofluorescencia.....	44
4.4. Ensayos de degradación.....	45
5. Reactivos.....	45
<b>Resultados.....</b>	<b>49</b>
1. Generación de un ratón condicionalmente deficiente para Cdc20.....	49
2. Caracterización fenotípica del ratón deficiente para Cdc20.....	50
2.1. Letalidad embrionaria temprana en el ratón deficiente para Cdc20.....	51
2.2. La ablación genética de Cdc20 provoca parada en metafase.....	53
3. Efecto de la eliminación condicional de Cdc20 en el ratón.....	55
3.1. Cdc20 es esencial en estadios tardíos del desarrollo embrionario.....	55
3.2. Cdc20 es esencial en el ratón adulto.....	57
4. Caracterización de la ablación de Cdc20 en células progenitoras.....	59
5. Caracterización de la eliminación condicional de Cdc20 en tumores.....	62
5.1. Efecto de la ablación condicional de Cdc20 en tumores benignos.....	62
5.2. Efecto de la ablación condicional de Cdc20 en tumores agresivos.....	65
6. Validación de Cdc20 como diana en la terapia contra el cáncer.....	69
6.1. La eliminación genética de Cdc20 es más eficaz induciendo muerte celular que las principales drogas antimitóticas.....	69
6.2. Regresión tumoral eficaz tras la eliminación de Cdc20.....	73
7. La inactivación concomitante de las quinasas Mastl y Cdk1 permiten la salida de mitosis en las células defectivas para Cdc20.....	75
8. La salida de mitosis requiere la activación del complejo PP2A-B55.....	84
<b>Discusión.....</b>	<b>91</b>
1. Cdc20, un gen esencial.....	92

2. ¿Es Cdc20 una buena diana en la terapia contra el cáncer?.....	95
3. ¿Tiene Cdc20 su talón de Aquiles? Requerimientos moleculares de la salida de mitosis en mamíferos.....	100
<b>Conclusiones.....</b>	<b>107</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>111</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>123</b>









## Abreviaturas

A:	Anafase
Ab:	Anticuerpo ( <u>A</u> nti <u>b</u> ody)
AdCre:	Adenovirus que expresa la recombinasa Cre
AdGFP:	Adenovirus que expresa la proteína GFP
APC/C:	Complejo promotor de la anafase o ciclosoma ( <u>A</u> naphase <u>P</u> romoting <u>C</u> omplex or <u>C</u> yclosome)
ATP:	Adenosina trifosfato
BrdU:	Bromodeoxiuridina
BSA:	Albúmina bovina sérica
CA3:	Caspasa 3 activa
Cdk:	Quinasa dependiente de ciclina ( <u>C</u> yclin <u>D</u> ependent <u>K</u> inase)
cDNA:	DNA codificante
CKI:	Inhibidores de Cdks ( <u>C</u> dk <u>I</u> nhibitor)
CNIO:	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
Cre:	Recombinasa Cre
Ctrol:	Control
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol (4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndole)
DMBA:	Dimetilbenzantraceno
DMEM:	Medio mínimo esencial de Dulbecco ( <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium)
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EdU:	5-etinil-2'-deoxiuridina
EGTA:	Etilen glicol bis
ES:	Células embrionarias madre ( <u>E</u> mbryonic <u>S</u> tem cell)
FBS:	Suero fetal bovino ( <u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
Flp:	Recombinasa Flp

FP:	Folículo piloso
GFP:	Proteína verde fluorescente ( <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
H&E:	Hematoxilina y eosina
hGC:	Gonadotropina coriónica humana
IF:	Inmunofluorescencia
IHQ:	Inmunohistoquímica
Inh1:	Inhibidor-1 de PP1
IP:	Inmunoprecipitación
KO:	Knock-out
M:	Fase M
MCC:	Complejo del punto de control del huso ( <u>M</u> itotic <u>C</u> heckpoint <u>C</u> omplex)
MEFs:	Fibroblastos embrionarios de ratón ( <u>M</u> ouse <u>E</u> mbryonic <u>F</u> ibroblast)
MPF:	Complejo promotor de la fase M ( <u>M</u> itotic <u>P</u> romoting <u>F</u> actor)
Neo:	Neomicina
Noc:	Nocodazol
OA:	Ácido okadaico
PBS:	Tampón fosfato salino ( <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PH3:	Fosfo-histona H3
Plk1:	Polo quinasa-1 ( <u>P</u> olo <u>l</u> ike <u>k</u> inase- <u>1</u> )
PM:	Prometáfase
PMSF:	Fluouro de fenilmetilsulfonio
PMSG:	Gonadotropina de suero de yegua preñada ( <u>P</u> regnant <u>M</u> are's <u>S</u> erum <u>G</u> onadotropin)
PP1:	Fosfatasa PP1 ( <u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>1</u> )
PP2A:	Fosfatasa PP2A ( <u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>2A</u> )
pRb:	Retinoblastoma
Purv:	Purvalanol
RNAi:	RNA de interferencia
Ros:	Roscovitina
SAC:	Punto de control de unión al huso ( <u>S</u> pindle <u>A</u> ssembly <u>C</u> heckpoint)
SCID:	Ratones con deficiencia inmunitaria severa ( <u>S</u> evere <u>C</u> ombined <u>I</u> mmune <u>D</u> eficiency)

SD:	Desviación estándar
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS ( <u>P</u> olyacril <u>a</u> mide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
siRNA:	RNA de interferencia ( <u>S</u> mall <u>I</u> nterference <u>R</u> NA)
Sta:	Staurosporina
T:	Telofase
TPA:	Tetradecanoforbol acetato
WB:	Transferencia de proteínas a membrana ( <u>W</u> estern <u>B</u> lot)
WT:	Animal de genotipo salvaje ( <u>W</u> ild <u>T</u> ype)
X:	<i>Xenopus</i>
4-OHT:	4-hidroxi-tamoxifeno



# Introducción





## Introducción

“Donde aparezca una célula, tiene que haber existido una célula previa, del mismo modo que los animales solo pueden surgir a partir de otros animales y las plantas a partir de otras plantas”. Esta teoría celular propuesta por el patólogo alemán Virchow a mediados del siglo XIX, contiene un importante mensaje. Las células solo pueden generarse a partir de células y la única forma de producir más células es a través de la división de las ya existentes. Así pues, todos los organismos vivos existentes en el planeta son el resultado de divisiones a partir de una célula ancestral originaria.

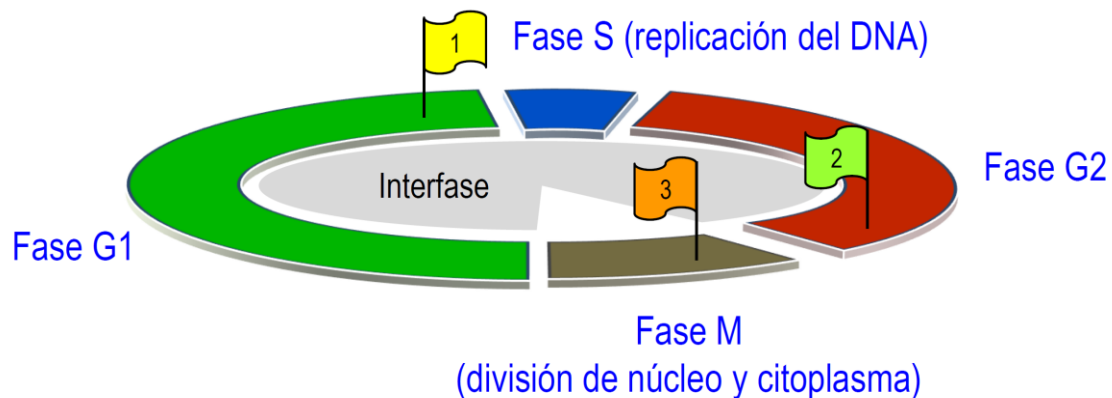
Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los cuales duplica su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo, es conocido como ciclo celular, y representa el mecanismo esencial mediante el cual todos los organismos se reproducen. En las especies unicelulares cada ciclo celular permite la generación de un nuevo individuo completo. En las especies pluricelulares, para generar un nuevo organismo funcional se requieren secuencias de divisiones celulares largas y complejas. Además, en organismos pluricelulares adultos se requiere la división celular para reemplazar las células que mueren.

El ciclo celular conserva características universales para todos los organismos, independientemente de su complejidad. El mínimo número de procesos que una célula tiene que llevar a cabo, son aquellos que le permitan cumplir la tarea más importante: la transmisión de la información genética a la generación siguiente de células. Para ello, cada célula duplicará cada uno sus genes y luego cada uno de los cromosomas replicados será repartido de forma fidedigna a cada una de las células hijas. Dada la importancia del ciclo celular como garante de vida, las células eucariotas han desarrollado mecanismos moleculares complejos que gobiernan la progresión a través del ciclo celular. El funcionamiento incorrecto de los estos mecanismos de regulación, o es incompatible con la vida o por el contrario resulta en la división descontrolada de la célula, característica esencial del cáncer.

## 1. El Ciclo celular

El ciclo celular de las células eucariotas consiste en la progresión a través de diferentes etapas que culminan en la división celular (Norbury and Nurse 1992). A lo largo de estas diferentes etapas se ha de asegurar la duplicación del material genético y la posterior repartición del mismo en dos células hijas. Estos procesos definen las dos fases principales del ciclo celular. La duplicación del DNA sucede en la fase S (S de síntesis), la cual supone la mitad del tiempo que dura el ciclo celular en una célula de mamífero. Después de la replicación del DNA, la segregación de los cromosomas y la división celular ocurren en la fase M (M de mitosis), la fase más rápida del ciclo celular (normalmente menos de una hora en una célula de mamífero).

La mayoría de las células tardan mucho más tiempo en crecer y duplicar su masa de proteínas y orgánulos que el que necesitan para duplicar su DNA y dividirse. En el ciclo celular se intercalan *fases de descanso* que permiten a la célula disponer de un mayor tiempo para crecer. Estas fases de descanso son la fase G1, entre la fase M y la fase S, y la fase G2, entre la fase S y la fase de mitosis. Así, el ciclo celular eucariota se divide en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M. Las fases G1, S y G2, son denominadas en su conjunto, interfase (Figura 1).



**Figura 1. Fases del ciclo celular.** La célula crece durante la interfase, la cual consta de tres fases: Fase S o de replicación de DNA; fase G1, intervalo entre fase M y S; fase G2: intervalo entre fase S y M. En la fase M o mitosis, la célula segrega los cromosomas duplicados y finalmente divide el citoplasma para dar lugar a dos células hijas idénticas. El tránsito a través del ciclo celular queda regulado por los puntos de control o checkpoints. Cada checkpoint es representado por una bandera. Bandera 1: checkpoint de fase G1; bandera 2: checkpoint de daño al DNA; bandera 3: checkpoint de unión al huso.

Las fases G1 y G2 proporcionan el tiempo necesario a la célula para asegurarse de que las condiciones extracelulares son adecuadas y de que se han completado todos los requisitos previos a la duplicación del DNA y a la división celular. La fase G1 es especialmente importante a este respecto. Si las condiciones son desfavorables, las células pueden retrasar su progresión a través de la fase G1, e incluso pueden entrar en un estado de reposo llamado G0 (G cero). En mamíferos, la mayor parte de las células de un adulto se encuentran en un estado de quiescencia, estando fuera del programa de división celular. Por analogía, se dice que las células que se encuentran en estado de quiescencia se encuentran en G0 o estado de reposo. Si las condiciones extracelulares son favorables y existen señales mitogénicas, las células que se encuentran en fase G1 temprana o fase G0 progresan a través de G1 alcanzando un punto de determinación próximo al final de G1, denominado inicio (en levaduras) o punto de restricción (en mamíferos) (Pardee 1974). Superado este punto, las células quedan determinadas para duplicar el DNA, incluso aunque desaparezcan las señales mitógenicas que estimulan el crecimiento y la división celular.

### **1.1. Componentes del sistema de control del ciclo celular**

El ciclo celular está regulado por un complejo mecanismo de control que garantiza la progresión secuencial a través de cada una de las fases del ciclo. Este sistema de control permite la activación de cada proceso en el momento adecuado, de manera ordenada e irreversible. Todas estas características otorgan al ciclo celular un carácter lineal y progresivo. Las bases moleculares de este mecanismo de control recaen en la actividad de una familia de proteínas quinasas denominadas quinasas dependiente de ciclina (Cdk), en la transcripción, y en la proteólisis catalizada por enzimas denominadas ubiquitinas ligasa y el complejo del proteosoma.

El mecanismo de control que gobierna el ciclo celular tiene la capacidad de reaccionar a la información procedente de los propios procesos que controla. Es decir, el sistema de control puede retrasar el progreso a la fase siguiente cuando se detecta un defecto en la secuencia de acontecimientos que están ocurriendo en ese mismo instante. Estas demoras en la progresión del ciclo celular proporcionan tiempo a la maquinaria encargada de reparar los defectos que hayan podido ocurrir, y así evitar el desastre que supondría la entrada prematura en la fase siguiente.

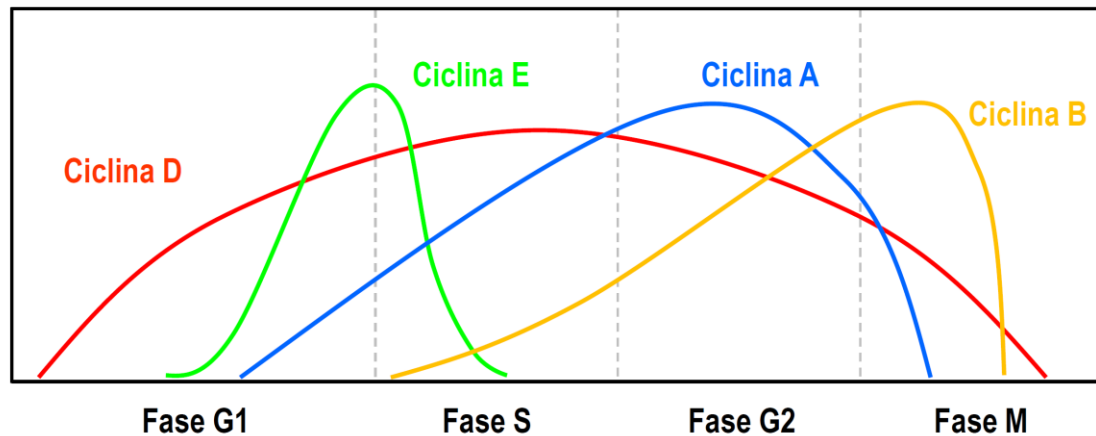
Los efectores de este retraso en la progresión normal del ciclo celular son los llamados puntos de control o checkpoints (Hartwell and Weinert 1989). Estos puntos de control no suelen actuar eliminando las señales positivas que estimulan la progresión a través del ciclo celular, sino que actúan a través de señales negativas que detienen el ciclo celular. Los puntos de control que tradicionalmente han sido descritos son tres: Punto de control de G1, punto de control de G2 o daño al DNA, y punto de control de la metafase o de unión al huso. Estos puntos detienen respectivamente, la entrada en fase S hasta que las condiciones del entorno sean favorables, la entrada en mitosis hasta que cualquier daño en el DNA haya sido reparado, y la segregación del material genético y la salida de mitosis hasta que todos los cromosomas estén unidos al huso (Figura 1) (Murray 1993).

### 1.1.1. Quinasas dependiente de ciclina

Las quinasas dependientes de ciclina (Cdk) constituyen el núcleo del sistema molecular que controla el ciclo celular (Malumbres and Barbacid 2005). Su actividad aumenta y disminuye permitiendo a la célula la transición ordenada a través de las distintas fases del ciclo. Las oscilaciones en su actividad permiten cambios cíclicos en el estado de fosforilación de las proteínas que regulan o ejecutan los principales acontecimientos que permiten la división celular (Morgan 1997).

Los cambios cíclicos en la actividad enzimática Cdk responden a un complejo mecanismo de regulación. Los reguladores más importantes de la actividad Cdk son las proteínas denominadas ciclinas. Las Cdk dependen de las ciclinas para realizar su actividad, la unión de las Cdk a las ciclinas permite la formación de complejos heterodiméricos activos. Las ciclinas experimentan ciclos de síntesis y degradación que provocan la oscilación periódica de sus niveles en cada ciclo celular (Evans et al. 1983) (Figura 2). En contraposición, las Cdk mantienen niveles constantes a lo largo del ciclo celular. Las oscilaciones periódicas en los niveles de ciclina permiten variaciones cíclicas en los ensamblajes y en la activación de los complejos Cdk-ciclina. Esta activación sucesiva desencadena los acontecimientos del ciclo celular. Solo 4 de las quinasas dependiente de ciclina parecen tener un papel claro en el control del ciclo celular: Cdk1, 2, 4 y 6. Cdk4 y Cdk6 controlan la progresión a través de la fase G1, mientras Cdk2 es necesaria para completar G1 e iniciar la fase S. Cdk4 y Cdk6 forman complejos con las ciclinas D (ciclinas D1, D2 y D3). Cdk2 es secuencialmente activada por las

ciclinas E (ciclinas E1 y E2) durante la transición G1/S, y las ciclinas A (ciclinas A1 y A2) durante la fase S. Cdk1 forma complejo con las ciclinas A regulando el tránsito a través de la fase G2, y con las ciclinas B (ciclinas B1 y B2) permitiendo la entrada en mitosis y el progreso a través de la misma (Malumbres and Barbacid 2005).



**Figura 2. Expresión de las ciclinas.** Cada una de las ciclinas involucradas en la regulación del ciclo celular sufre ciclos de síntesis y degradación, permitiendo la progresión lineal a través de las distintas fases del ciclo celular.

A pesar de que el aumento y la disminución de los niveles de ciclinas a lo largo del ciclo celular es el principal determinante de la actividad Cdk, existen otros mecanismos importantes que permiten regular con precisión la actividad Cdk en etapas concretas del ciclo celular.

Los complejos Cdk-ciclina son regulados por la unión de proteínas inhibidoras de Cdk, denominadas CKI (de Cdk inhibitor proteins). Existe una gran variedad de proteínas CKI que se agrupan fundamentalmente en dos familias, la familia INK4, que incluye a las proteínas p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup>, y la familia Cip/Kip, formada por las proteínas inhibidoras p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>. Estos inhibidores participan fundamentalmente en el control de las fases G1 y S (Morgan 1995).

Las quinasas dependientes de ciclina también son reguladas por fosforilación. Estas fosforilaciones pueden incrementar su actividad catalítica, como es el caso de Cdk2 cuando es fosforilada en la treonina 160 (T160), o pueden resultar en la inhibición de su actividad quinasa, como es el caso de Cdk1 cuando es fosforilada en dos residuos treonina y tirosina (T14 y Y15) (Gu et al. 1992; Lindqvist et al. 2009). De la misma manera, la eliminación de estos fosfatos

contribuye a la precisa regulación de la actividad Cdk en las distintas fases del ciclo celular (Sullivan and Morgan 2007).

### **1.1.2. Regulación transcripcional del ciclo celular**

En organismos inferiores el control del ciclo celular depende únicamente de mecanismos post-transcripcionales que regulan la actividad Cdk. Sin embargo, en los ciclos celulares más complejos, el control transcripcional proporciona un nivel adicional de regulación. La proteína supresora de tumores retinoblastoma (pRb) constituye el freno a la progresión a través del ciclo celular en las células normales. La proteína pRb bloquea la transcripción de los genes necesarios para la entrada en fase S en células quiescentes (Harbour and Dean 2000; Kaelin 1999). En G0, pRb se encuentra no fosforilada y forma complejos con el factor de transcripción E2F, impidiendo el inicio de la transcripción de genes necesarios para la división celular (Ishida et al. 2001; Polager et al. 2002). Cuando las señales mitogénicas estimulan la proliferación celular, diversas cascadas señalizadoras inducen la expresión de las ciclinas D permitiendo la formación de complejos con Cdk4 y Cdk6 (Malumbres and Pellicer 1998). Estos complejos heterodiméricos comienzan a fosforilar a pRb disminuyendo su afinidad por E2F. Una vez disociado, E2F promueve la expresión de proteínas esenciales en la regulación del ciclo celular.

### **1.1.3. Control del ciclo celular mediante proteólisis cíclica**

El control del ciclo celular depende de dos complejos enzimáticos que participan en diferentes momentos del ciclo en la proteólisis de reguladores clave del ciclo celular (King et al. 1996). Como anteriormente hemos citado, los niveles de ciclina a lo largo del ciclo celular están perfectamente regulados por proteólisis, al igual que el de otros reguladores esenciales del ciclo celular. Esta proteólisis de ciclinas y otros reguladores está basada en un mecanismo dependiente de ubiquitina (Pagano 1997). Aquellas ciclinas y reguladores que han de ser degradados en momentos específicos del ciclo celular son ubiquitinados por complejos enzimáticos para su posterior degradación por el proteosoma. El paso limitante en el proceso de degradación de estas proteínas es la transferencia de ubiquitina catalizada por las enzimas ubiquitinas-ligasa. Dos ubiquitinas-ligasa son responsables de la degradación de los principales reguladores del ciclo celular. En las fases G1 y S, el complejo llamado SCF (de proteínas SKP1-

CUL1-F-box) participa en la ubiquitinación de las ciclinas D, E y A, y de ciertas proteínas CKI que regulan la transición G1/S. En mitosis, el complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/, de anaphase promoting complex or cyclosome) es el encargado de ubiquitinar las ciclinas A y B, y otros reguladores mitóticos, permitiendo la segregación de los cromosomas duplicados y la salida de mitosis (Nakayama and Nakayama 2006).

## 2. La Mitosis

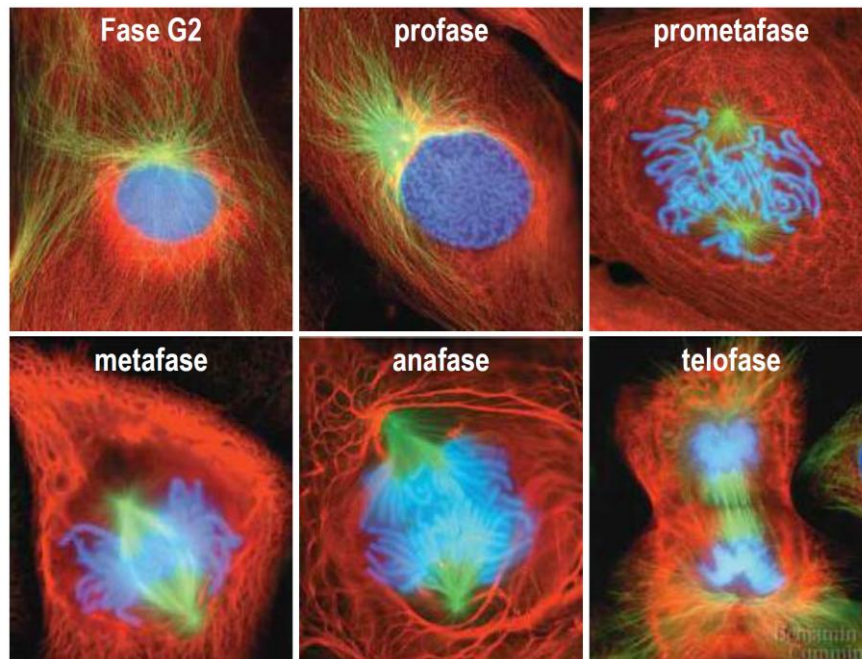
El término mitosis fue acuñado por Whalter Flemming en el año 1880 para definir la fase que constituye el punto culminante del ciclo celular. Se trata de la etapa en la que se produce el reparto fidedigno del material genético en las dos células hijas.

El principal problema de una célula en mitosis es cómo separar y distribuir sus cromosomas duplicados con la mayor precisión, de tal manera que cada una de las células hijas reciba una copia idéntica del genoma. Este problema es resuelto de manera similar por todas las células eucariotas. Las células eucariotas ensamblan redes de citoesqueleto que constituyen el denominado huso mitótico, que junto con las proteínas motoras, permiten la separación de los cromosomas duplicados y finalmente la escisión del citoplasma. Antes de que los cromosomas duplicados puedan separarse y repartirse, estos han de configurarse de forma adecuada. Cuando todos los cromosomas se han duplicado en la fase S, las dos copias de cada uno de los cromosomas permanecen unidas como cromátidas hermanas idénticas. La cohesión entre estas cromátidas hermanas es posible gracias a unas moléculas denominadas cohesinas, que son dispuestas a lo largo de los cromosomas a medida que estos son duplicados. Dicha cohesión es esencial para la correcta segregación del material genético y solo se rompe para permitir la separación de los cromosomas duplicados cuando la célula alcanza un estadio avanzado de la mitosis (Nasmyth and Haering 2009).

La mitosis tradicionalmente se ha dividido en cinco etapas; profase, prometafase, metafase, anafase y telofase, que se producen secuencialmente siguiendo estrictamente este orden (Figura 3). Se considera el inicio de la mitosis, y así la profase, cuando los primeros cromosomas comienzan a ser condensados. La subsiguiente ruptura de la envuelta nuclear determina el final de esta fase y da inicio a la prometafase, durante la cual el huso captura a los cromosomas. Se considera metafase una vez todos los cromosomas han sido capturados por los



microtúbulos y están perfectamente alineados formando la placa metafásica. El inicio de la anafase está marcado por la separación de las cromátidas hermanas y su movimiento hacia los polos opuestos del huso. Finalmente, durante la telofase, los cromosomas adyacentes se fusionan para dar lugar a dos núcleos idénticos. Paralelamente al inicio de la anafase comienza la división del citoplasma o citocinesis que culmina la división celular (Robbins and Gonatas 1964).



**Figura 3. Proceso de la mitosis en una célula animal.** El comienzo de la condensación de cromosomas ocurre al inicio de la profase. En la prometafase los cromosomas son capturados por el huso mitótico y después son alineados en la placa metafásica definiendo la metafase. Durante la anafase el material genético es segregado y ya en telofase, comienza la descondensación de los cromosomas que dan lugar a dos nuevos núcleos. (Azul: cromosomas; verde: microtúbulos del huso mitótico; rojo: actina). (Micrografías de C.L. Rieder).

## 2.1. Bases moleculares de la entrada y progresión en mitosis

En el año 1971 fue descrito el “Factor promotor de la fase M” (MPF, de M phase-promoting factor) como mediador molecular de la entrada en mitosis (Masui and Markert 1971). Quince años después, este factor fue caracterizado resultando ser el complejo heterodimérico Cdk1-ciclina B (Gautier et al. 1988; Gautier et al. 1990). La transcripción de ciclina B comienza al inicio de la fase S y se alcanzan niveles máximos de esta proteína en los estadios finales de la fase G2 (Fung and Poon 2005). Los factores de transcripción que activan la expresión de ciclina



B, FoxM1, NF-Y y B-myb, son a su vez activados por la actividad Cdk (Katula et al. 1997; Luscher-Firzlaff et al. 2006; Ziebold et al. 1997). Así, una vez se produce la formación de los complejos Cdk2-ciclina A en fase S y G2, comienza la expresión de la ciclina B. Durante la fase S y la mayor parte de la fase G2, los complejos Cdk1-ciclina B se encuentran predominantemente localizados en citoplasma (Takizawa and Morgan 2000). En las últimas etapas de la fase G2, la ciclina B es fosforilada en su extremo amino-terminal acumulándose rápidamente en el núcleo de la célula (Hagting et al. 1999). Sin embargo, la mera asociación de Cdk1 con la ciclina B y la localización de este complejo en el núcleo no son suficientes para su completa activación. La subunidad Cdk de este complejo está sujeta a modificaciones post-transduccionales que regulan su actividad quinasas. El principal mecanismo post-transduccional que regula la actividad de Cdk1 es la fosforilación. Cdk1 necesita ser fosforilada en la treonina 161 (T161) para catalizar su actividad quinasas (Poon et al. 1993). A su vez, Cdk1 formando complejo con la ciclina B en interfase, es fosforilada en los residuos treonina 14 (T14) y tirosina 15 (Y15) resultando en la inhibición de su actividad (Morgan 1995). La desfosforilación de estos residuos supone la completa activación de Cdk1 y la rápida entrada en mitosis.

La fosforilación de Cdk1 en los residuos T14 y Y15 durante la fase G2 está controlada por el balance entre actividad quinasas y fosfatasa. Las quinasas responsables de la fosforilación de estos residuos y así de la inhibición de Cdk1, son Wee1 y Myt1 (O'Farrell 2001). Una vez Cdk1 es parcialmente activado por fosforilación en el residuo T161 y se alcanzan niveles residuales de actividad quinasas, se desencadena una cascada de señalización en la que Cdk1-ciclina B fosforila a sus dos reguladores negativos, Wee1 y Myt1, induciendo la degradación de Wee1 y la inhibición de Myt 1 (Booher et al. 1997; Watanabe et al. 2004). Cdk1 a su vez, es responsable de la activación de las fosfatasas encargadas de defosforilar sus propios residuos T14 y Y15. Las fosfatasas responsables de la activación completa de Cdk1 son las proteínas Cdc25. En células humanas Cdc25 presenta tres isoformas: Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C. El papel de cada una de ellas en la activación de Cdk1 no está perfectamente definido, aunque parece que la isoforma Cdc25B es la que inicia la completa activación de Cdk1 (Lindqvist et al. 2005). De esta manera y a través de complejos mecanismos de amplificación de señal, Cdk1 es responsable de su propia activación, activando a sus activadores e inhibiendo a sus inhibidores (Lindqvist et al. 2009).

Durante la transición G2/M, la ciclina B no parece ser la única ciclina que sustenta la actividad Cdk. La eliminación parcial de ciclina A retrasa la translocación de los complejos Cdk1-

ciclina B al núcleo, ralentizando la entrada en mitosis. Estos resultados sugieren un posible papel de ciclina A como activador directo del complejo Cdk1-ciclina B en la fase G2 (De Boer et al. 2008; Fung et al. 2007).

A pesar de que la activación del complejo Cdk1-ciclina B constituye el principal requerimiento para iniciar la mitosis, otras proteínas juegan un papel importante, ya sea en la ejecución de los mecanismos necesarios para la entrada o progresión durante esta fase, o participando en niveles adicionales de regulación de la actividad Cdk1. La mayor parte de estas proteínas reguladoras de mitosis son las denominadas quinasas mitóticas. Las quinasas mitóticas más importantes son las pertenecientes a las familias de las Polo-quinasas, las Aurora-quinasas y las Nek-quinasas.

La familia Polo quinasa está constituida por cinco miembros en mamíferos, siendo la Polo-quinasa 1 (Plk1, de Polo-like kinase-1) el miembro mejor caracterizado. Plk1 participa en la activación de Cdk1 favoreciendo la inhibición de los reguladores negativos de Cdk1, Wee1 y Myt1 (Nakajima et al. 2003; Watanabe et al. 2004). En el mismo sentido, Plk1 regula la actividad quinasa de Cdk1 facilitando la entrada en el núcleo del complejo Cdk1-ciclina B mediante la fosforilación de ciclina B (Toyoshima-Morimoto et al. 2001). Sin embargo, el papel de Plk1 no solo se reduce a regular la activación de Cdk1 en la entrada en mitosis. Durante la transición G2/M, Plk1 promueve la maduración de los centrosomas, hecho esencial para la formación de un huso mitótico bipolar (Lane and Nigg 1996), y activa al factor de transcripción FoxM1, el cual potencia la transcripción de los genes necesarios para la entrada en mitosis, incluyendo ciclina B, Plk1 y las fosfatasas Cdc25 (Fu et al. 2008).

Las proteínas Aurora A, B y C conforman la familia de las Aurora quinasas en mamíferos. A pesar de su alto grado de homología, solo Aurora A y B parecen desarrollar funciones durante la mitosis. Aurora A participa, al igual que Plk1, en la maduración de centrosomas, en la formación del huso mitótico y en la activación de Cdk1, fosforilando y activando a Cdc25B (Barr and Gergely 2007; Dutertre et al. 2004). Durante estadios tardíos de la fase G2, el segundo miembro de la familia, Aurora B, fosforila la Histona H3 en la serina 10. Esta fosforilación está relacionada con la condensación de cromosomas, evento indispensable para la entrada en mitosis (Hsu et al. 2000).

La familia de las Nek-quinasas (o NIMA-related kinase family) está constituida por 11 miembros. La quinasa Nek2 es el miembro mejor caracterizado. Nek2 participa en el

mantenimiento y modulación de la estructura del centrosoma. Estudios recientes proponen a Nek2 como la quinasa que regula la separación de los centrosomas duplicados al inicio de mitosis mediante la fosforilación de las proteínas centriolares (Fry et al. 1998).

En definitiva, se puede concluir que la puesta en marcha de los mecanismos que permiten la división celular ocurre como consecuencia de la activación ordenada y regulada de las denominadas quinasas mitóticas.

## **2.2. Bases moleculares de la salida de mitosis**

Una vez los cinetocoros están unidos a los microtúbulos y todos los cromosomas se encuentran alineados en la placa metafásica, la célula está preparada para iniciar la salida de mitosis. Para ello, la célula ha de invertir todos los complejos cambios que se han producido al inicio de la mitosis. Los cromátidas han de segregarse, el huso tiene que desensamblarse, los cromosomas descondensarse y la envoltura nuclear reorganizarse. Dado que la fosforilación de las proteínas por las diferentes quinasas constituye el motor de entrada en mitosis, no es sorprendente que la defosforilación de estas mismas proteínas sea necesaria para iniciar la salida de mitosis. Estas defosforilaciones y la salida de mitosis se produce por dos procesos: la inactivación de las quinasas mitóticas y la activación de fosfatasas (Sullivan and Morgan 2007).

En las células humanas más de un millar proteínas son fosforiladas para garantizar la entrada y la progresión en mitosis, la gran mayoría por Cdk1 (Dephoure et al. 2008). Es por este motivo por el que la activación de las fosfatasas es completamente necesaria para desencadenar la salida de esta fase del ciclo celular. A pesar de que el mecanismo de activación de la fosfatasa que media la salida de mitosis en levaduras, Cdc14, está perfectamente caracterizado (Visintin et al. 1998), poco se sabe acerca de las fosfatasas que actúan en la salida de mitosis de mamíferos. La mera defosforilación de las proteínas mitóticas en la salida de mitosis no es suficiente para desencadenar este evento, se requiere también la inactivación de la actividad quinasa. La inactivación de las quinasas mitóticas se produce mediante proteólisis dependiente de ubiquitina. Como ya describimos en un apartado anterior y describiremos ampliamente en el siguiente punto, el complejo enzimático que cataliza la ubiquitinación de las principales proteínas mitóticas es el denominado Complejo Promotor de la Anafase o Ciclosoma (APC/C) (Townesley and Ruderman 1998).

### 2.2.1. El complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C)

Estudios bioquímicos y genéticos identificaron en el año 1995 la actividad catalítica requerida para la degradación de las ciclinas. Este complejo catalítico fue denominado *Complejo Promotor de la Anafase o Ciclosoma* (APC/C) ya que su actividad permite la separación de las cromátidas hermanas y el inicio de la salida de mitosis (King et al. 1995).

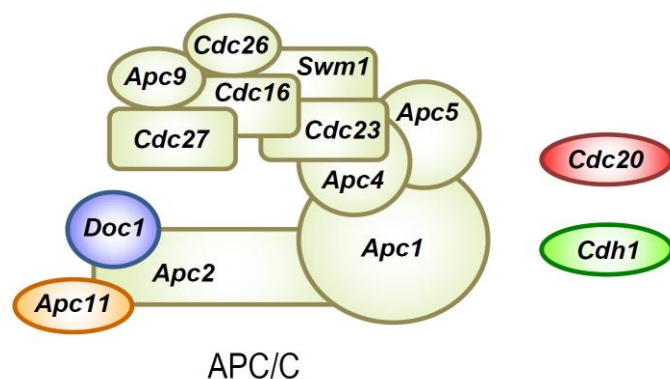
El APC/C es una ubiquitina-ligasa E3 que cataliza la unión de moléculas de ubiquitina a proteínas concretas para su posterior reconocimiento y degradación por el proteosoma 26S (Peters 2006; Thornton and Toczyski 2006). El APC/C es un complejo multimérico constituido al menos por 12 subunidades en

mamíferos (Peters 2006) y dos cofactores adicionales, Cdc20 y Cdh1 (Figura 4). Estos coactivadores se unen transitoriamente con el complejo y son absolutamente necesarios

para la actividad del mismo. Mientras Cdc20 es el cofactor mitótico, Cdh1 activa el complejo desde estadios tardíos de la mitosis hasta la transición G1/S.

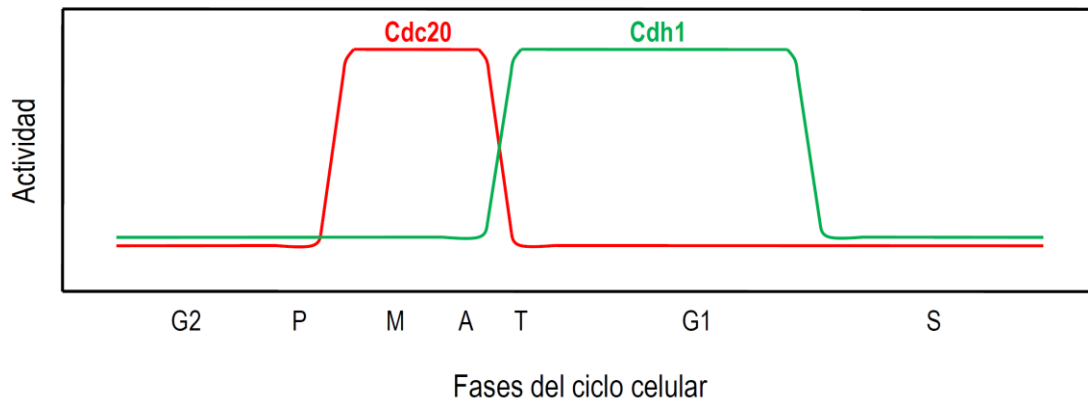
Ambos cofactores participan activamente en el reconocimiento de aquellos sustratos que van a ser ubiquitinados por el APC/C, contienen un dominio WD40 en su extremo C-terminal que les permite establecer interacciones específicas con dominios tales como D-box, KEN-box, A-Box o O-Box (Araki et al. 2005; Fang et al. 1998; Littlepage et al. 2002; Pfleger and Kirschner 2000).

La unión secuencial de Cdc20 y Cdh1 al APC/C está regulada por mecanismos de fosforilación. Cdc20 se une al APC/C cuando varias subunidades del complejo han sido fosforiladas al inicio de mitosis por quinasas como Cdk1 y Plk1 (Golan et al. 2002; Rudner and Murray 2000). Contrariamente, la interacción APC/C-Cdh1 no depende de la fosforilación de las subunidades del APC/C. La fosforilación de Cdh1 por Cdk2 o Cdk1 durante la fase S, G2 y entrada en mitosis, impide su interacción con el APC/C hasta estadios tardíos de la mitosis



**Figura 4. El complejo promotor de la anafase ó APC/C.** El APC/C está constituido por al menos doce subunidades en mamíferos. La actividad catalítica del complejo requiere la unión de un cofactor. Cdc20 y Cdh1 son los cofactores que permiten regular la actividad del APC/C a lo largo del ciclo celular.

cuando se produce una reducción de los niveles de actividad Cdk (Blanco et al. 2000; Zachariae et al. 1998a) (Figura 5).



**Figura 5. Activación del complejo APC/C por Cdc20 y Cdh1 durante el ciclo celular.** El APC/C es activado por Cdc20 al inicio de mitosis cuando las diferentes subunidades del APC/C son fosforiladas. Una vez iniciada la salida de mitosis y cuando la actividad Cdk alcanza un nivel residual, Cdh1 reemplaza a Cdc20 en la activación del APC/C. Cdh1 mantiene activo al APC/C hasta alcanzar los estadios finales de la fase G1.

### 2.2.1.1. APC/C-Cdc20 y el punto de control de unión al huso

Cdc20 fue identificado en el año 1973 por Lee Hartwell, junto con otros reguladores del ciclo celular, en estudios genéticos pioneros realizados en *Saccharomyces cerevisiae*. La mutación de Cdc20 resultó en la parada permanente del ciclo celular en mitosis y en el fallo para iniciar la anafase (Hartwell et al. 1973).

Como anteriormente hemos mencionado, Cdc20 se une al APC/C al inicio de mitosis cuando varias de las subunidades de este complejo han sido fosforiladas (Kramer et al. 2000). La actividad de APC/C-Cdc20 es regulada por varios mecanismos. El mecanismo más importante es el *punto de control de unión al huso* o SAC (SAC, de *spindle assembly checkpoint*). El SAC es un mecanismo de supervivencia que garantiza la correcta segregación de los cromosomas evitando la generación de células aneuploides. Este punto de control inhibe la actividad de APC/C-Cdc20 y retrasa el inicio de la anafase hasta que todos los cromosomas están correctamente unidos a los microtúbulos del huso (Musacchio and Salmon 2007). El mecanismo por el cual el SAC inhibe la actividad de APC/C-Cdc20 no es bien conocido. El complejo MCC (MCC, de mitotic checkpoint complex) ha sido descrito como un posible efector del SAC (Varetti and Musacchio 2008). Este complejo está constituido por tres de los

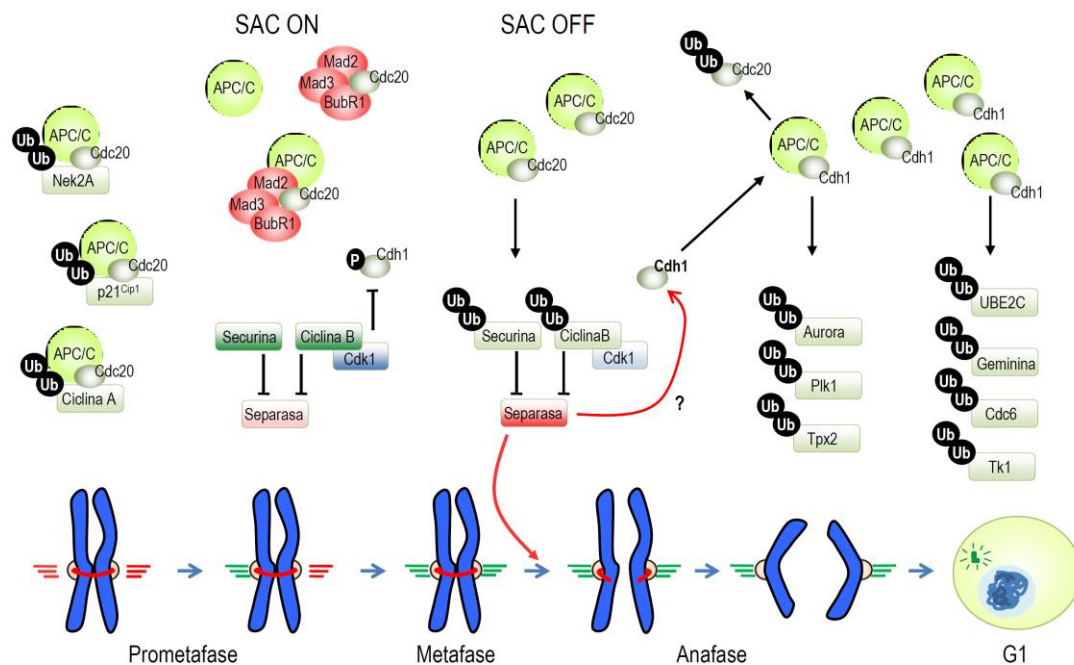
denominados genes del SAC, Mad2, BubR1/Mad3 y Bub3, que junto con Cdc20 se unen al APC/C como pseudosustrato impidiendo su actividad catalítica y retrasando el inicio de la anafase. Diversos estudios genéticos y estructurales establecen un modelo donde la formación del complejo MCC es facilitada por interacciones específicas entre Mad1 y Mad2 en aquellos cinetocoros que aún no han sido capturados por el huso. Esta interacción induce un cambio conformacional en Mad2 que le permite formar un complejo con Cdc20 y BubR1 (Musacchio and Salmon 2007). En este modelo, el APC/C se mantendría inactivo tanto por el secuestro de su coactivador Cdc20 por el complejo MCC, como por la unión de dicho complejo al APC/C a través de Cdc20, impidiendo así el reconocimiento y la ubiquitinación de otros sustratos. Sin embargo, en la célula la mayor parte de las moléculas de Cdc20 no se encuentran formando complejos con Mad2. Así, estudios basados en esta evidencia sugieren que la propia ubiquitinación de Cdc20 por el APC/C constituye el principal mecanismo por el cual el SAC impide la entrada en anafase. En este modelo, Mad2 actuaría como catalizador de la interacción entre Cdc20 y BubR1, el cual presentaría a Cdc20 al APC/C para su posterior ubiquitinación (Ge et al. 2009; Nilsson et al. 2008).

Una vez todos los cromosomas están correctamente unidos al huso en la placa metafásica, el punto de control queda satisfecho y por tanto se extingue su actividad. Al igual que sucede con el mecanismo efector del SAC, poco se sabe acerca del mecanismo que neutraliza la señal inhibitoria generada por el punto de control de unión al huso. Diversos estudios avalan la hipótesis de que la multiubiquitinación de Cdc20 dependiente de la actividad catalítica de APC/C constituye el principal mecanismo de inactivación del SAC. La multiubiquitinación del cofactor implicaría su rápida disociación del complejo Mad2-BubR1-Bub3 para su posterior unión al APC/C. En contraposición, mientras el SAC no estuviese satisfecho, enzimas deubiquitininas desubiquitarían al coactivador Cdc20 estabilizando el complejo Cdc20-Mad2-BubR1-Bub3 que impide la activación de APC/C (Reddy et al. 2007; Stegmeier et al. 2007).

APC/C-Cdc20 inicia la anafase y consecutivamente la salida de mitosis mediante la ubiquitinación de los inhibidores de la proteína separasa, securina y ciclina B (Lim et al. 1998; Shirayama et al. 1999). La securina es una pequeña proteína que actúa como inhibidor estequiométrico de la separasa, mientras que el complejo Cdk1-ciclina B la inhibe por fosforilación y unión directa (Stemmann et al. 2001). La degradación de securina y ciclina B conduce a la activación de separasa, lo cual permite escindir las cohesinas centroméricas liberando las cromátidas hermanas. Paralelamente, la degradación de ciclina B supone la

inactivación de Cdk1, el principal motor de la progresión mitótica (Figura 6). Esta inactivación es el principal evento molecular que permite invertir todos los cambios que se han producido al inicio de la mitosis para comenzar la salida de la misma (S. Sigrist et al. 1995).

Una vez cesa la actividad quínasa de Cdk1 y se produce la activación de las fosfatasa, la eliminación de los fosfatos de Cdh1 resulta en la formación de los complejos APC/C-Cdh1. APC/C-Cdh1 cataliza la degradación de las quinasas mitóticas Aurora A y Plk1, lo que facilita la salida de mitosis y la progresión a través de la fase G1 (Figura 6). Sin embargo, estudios genéticos han demostrado la dispensabilidad de Cdh1 en organismos inferiores y en el ciclo celular de las células de mamífero (García-Higuera et al. 2008).



**Figura 6. Funciones del APC/C en el ciclo celular.** Durante las etapas tempranas de la mitosis, el complejo APC/C-Cdc20 cataliza la ubiquitinación de varios sustratos como son Nek2A, ciclina A y p21<sup>Cip1</sup>. La degradación de estos sustratos no está bajo la regulación del punto de control de unión al huso. Sin embargo, en respuesta a la presencia de cinetocoros no unidos al huso, el SAC es activado y el APC/C inhibido por el secuestro de Cdc20 o por la formación de los complejos APC/C-Cdc20-MCC. Bajo estas circunstancias, la securina y Cdk1-ciclina B actúan como inhibidores de la proteína separasa. Una vez todos los cinetocoros han sido capturados por los microtúbulos del huso, la actividad del SAC desaparece y se produce la completa activación del complejo APC/C-Cdc20. APC/C-Cdc20 cataliza la degradación de ciclina B y securina, lo que conlleva la activación de la separasa y la subsiguiente segregación de los cromosomas. En levaduras, la activación de la separasa conduce a la desfosforilación de Cdh1 a través de un mecanismo molecular que aún no ha sido establecido en células de mamíferos (signo de interrogación). Los nuevos complejos APC/C-Cdh1 permiten iniciar la entrada y la progresión en la fase G1 a través de la ubiquitinación de otros reguladores mitóticos.

Importantes trabajos en levadura han demostrado que los únicos sustratos esenciales de APC/C-Cdc20 son securina y ciclina B (Shirayama et al. 1999; Thornton and Toczyski 2003). A pesar de eso, este complejo tiene también la capacidad de ubiquitinar y promover la degradación de otros sustratos como ciclina A, Nek2A y p21<sup>Cip1</sup>. Estos sustratos son ubiquitinados por APC/C-Cdc20 y degradados por el proteosoma al inicio de mitosis, antes de que todos los requerimientos del SAC estén satisfechos (Amador et al. 2007; Geley et al. 2001). Estudios recientes sugieren que la degradación de estas proteínas de manera independiente a la actividad del SAC se debe fundamentalmente a dos motivos: la capacidad de estos sustratos para unirse al APC/C de manera previa a la activación de este *checkpoint* y la gran afinidad que presentan estas proteínas por Cdc20, lo que facilita el desplazamiento de las proteínas del SAC en su unión con el coactivador (Di Fiore and Pines ; Wolthuis et al. 2008).

### 2.2.2. La desfosforilación como regulador de la salida de mitosis

Como anteriormente hemos descrito, el motor de entrada y progresión en mitosis lo constituye la actividad quinasas, fundamentalmente la dada por Cdk1. Por este motivo, no es sorprendente pensar que durante la salida de mitosis todas aquellas proteínas que hayan sido fosforiladas deban ser desfosforiladas. Las numerosas fosfatasas existentes en la célula mantienen niveles basales de actividad durante todo el ciclo celular. Así, la mera inactivación de la actividad Cdk supondría la desfosforilación de sus sustratos y la salida de mitosis. A pesar de que este escenario es posible, existen sobradas evidencias para pensar que es poco probable. En levaduras, la inhibición de Cdk1 y la actividad de la proteína separasa conducen a la activación progresiva de la fosfatasa Cdc14 que permite defosforilar secuencialmente los diferentes sustratos de Cdk1, lo que facilita los eventos propios de la salida de mitosis (Stegmeier and Amon, 2004, Ann Rev Gen).

En mamíferos, poco se sabe acerca de la fosfatasa que media la salida de mitosis (Bollen et al. 2009). Los ortólogos de Cdc14 en vertebrados, Cdc14A y Cdc14B, no parecen jugar un papel crítico en este estadio (Queralt and Uhlmann 2008), sugiriendo la probable implicación de otras fosfatasas. Los estudios realizados en oocitos fertilizados de *Xenopus laevis*, demuestran el requerimiento de la fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina, en la salida de meiosis II (Mochida and Hunt 2007). Estudios similares en extractos de células embrionarias de *Xenopus* han revelado un papel clave de la fosfatasa PP1 en la desfosforilación



de los sustratos de Cdk1 en la salida de mitosis. La inhibición química de Cdk1 conduce a la activación de PP1 por auto-desfosforilación y por inactivación de su inhibidor I1 (Wu et al. 2009). Sin embargo, diversas evidencias apuntan a PP2A como la fosfatasa esencial en la salida de mitosis de mamíferos. Estudios en células humanas, utilizando tecnología de RNA de interferencia y videomicroscopía, han señalado a PP2A-B55 como la fosfatasa responsable de la descondensación del DNA, la formación de la envoltura nuclear y de otros muchos eventos propios de la salida de mitosis (Schmitz et al.). Este trabajo avala evidencias previas que demuestran como la fosfatasa que media la salida de la fase M en mamíferos es sensible a la inhibición por ácido okadaico, un inhibidor específico de PP2A a bajas concentraciones (Felix et al. 1990). A pesar de que PP2A parece ser la fosfatasa mitótica en organismos superiores, poco o nada se sabe acerca del mecanismo que permite su activación. La inhibición de Cdk1-ciclina B parece no ser suficiente para inducir la salida de mitosis en presencia de inhibidores del proteosoma, lo que sugiere un nuevo mecanismo que implicaría la inactivación dependiente del proteosoma de los inhibidores específicos de esta fosfatasa (Skoufias et al. 2007).

En estos últimos años ha quedado claro que además de la inactivación proteolítica de las quinasas mitóticas, las fosfatasas juegan un papel esencial en la regulación de la salida de mitosis. Sin embargo, muchas preguntas permanecen aún sin contestar. De especial interés es conocer las proteínas claves que han de desfosforilarse para que se ejecuten los complejos eventos que permiten la progresión hasta la fase siguiente. Pero aún de mayor interés es entender como presumiblemente la actividad proteolítica dependiente de APC/C coordina espacial y temporalmente la inactivación de las quinasas mitóticas y la activación de las fosfatasas reguladoras de la mitosis.

### **3. El cáncer como enfermedad del ciclo celular**

Durante las últimas dos décadas un importante número de estudios han documentado la relevancia de la desregulación del ciclo celular en diferentes tumores humanos (Malumbres and Barbacid 2001). El desarrollo tumoral es un proceso que requiere de sucesivas etapas cada una de las cuales supone la adquisición de alteraciones genéticas que conllevan a la progresiva transformación de una célula humana normal en una célula maligna. Todas estas observaciones nos permiten establecer una clara analogía entre la teoría evolutiva de Darwin y el desarrollo tumoral, en el cual la sucesión de cambios genéticos adquiridos por una célula da lugar a la

transformación tumoral. En un intento por describir las distintas alteraciones genéticas propias del desarrollo tumoral, Hanahan y Weinberg han enunciado seis características biológicas que son comunes, sino a todos, a la gran mayoría de los tipos tumorales. Dentro de estas seis características, cabe destacar el grupo de mutaciones que suponen la ruptura entre el programa de crecimiento celular y las señales mitogénicas o antimitogénicas del entorno. Las células normales requieren de estímulos mitogénicos para dar inicio al programa de crecimiento celular y pasar así, de un estado quiescente a un estado activo de proliferación. En sentido contrario a este comportamiento fisiológico, las células tumorales desarrollan la capacidad de generar sus propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia de aquellas señales mitogénicas que provienen del entorno en que se encuentran. Dentro de este entorno tisular, la quiescencia y la homeostasis celular es conseguida gracias a las múltiples señales antiproliferativas que difunden a través de la matriz extracelular. Las células cancerosas adquieren mutaciones en distintas rutas moleculares que las hacen insensibles a cualquier señal antimitogénica (Hanahan and Weinberg 2000).

La proliferación descontrolada de las células tumorales es consecuencia de la acumulación de mutaciones en reguladores principales de la maquinaria celular, así como de la inestabilidad genómica y cromosómica, características comunes a un alto porcentaje de tumores. Todas estas alteraciones no solo suponen un incremento en la capacidad proliferativa de la célula, sino que suponen un incremento en la susceptibilidad de las células para adquirir un mayor número de alteraciones genéticas que contribuyen al desarrollo tumoral y a la adquisición de un fenotipo maligno mucho más agresivo.

Sin embargo, las células tumorales no solo desarrollan la capacidad de proliferar por sí mismas y evadir cualquier señal antiproliferativa; adquieren la capacidad de eludir cualquier señal que dicte la muerte celular, adquieren un potencial ilimitado para duplicar el material genético, desarrollan capacidades angiogénicas y por último, ponen en marcha mecanismos que las permiten invadir tejidos adyacentes (Hanahan and Weinberg 2000). En su conjunto, estas seis alteraciones constituyen la esencia de la transformación maligna.

Por tanto, a pesar del carácter progresivo y sucesivo que presenta el desarrollo tumoral, podemos establecer el concepto de cáncer como enfermedad del ciclo celular, atendiendo a las múltiples evidencias que demuestran como la desregulación del ciclo celular supone un requisito indispensable en la génesis del tumor.

### 3.1. Dianas en la terapia antineoplásica: la mitosis

La mitosis, como etapa culminante del ciclo celular, constituye una atractiva diana en el control de los desordenes proliferativos. Los fármacos más efectivos que han sido desarrollados hasta el momento en la terapia contra el cáncer son las denominadas drogas antimitóticas (Kaestner and Bastians). Especial referencia hay que hacer a aquellas moléculas antimitóticas que actúan a nivel de la dinámica de la polimerización de los microtúbulos. Como anteriormente hemos descrito, los microtúbulos conforman el huso mitótico que durante la mitosis permite la segregación de los cromosomas y finalmente la división del citoplasma para dar lugar a dos células hijas. Los fármacos que afectan a la dinámica de microtúbulos suelen ser clasificados en dos grandes grupos, aquellos que inhiben la polimerización del microtúbulo (vinca-alcaloides) y aquellos que la estabilizan (taxanos y epotilones). Muchos de estos fármacos presentan una elevada actividad farmacológica frente a un amplio número de tumores, sin embargo, presentan importantes efectos adversos como la neurotoxicidad, presumiblemente por la afectación de los microtúbulos neuronales (Jordan and Wilson 2004). En los últimos años, el avance en el conocimiento de las bases moleculares que controlan la división celular ha permitido identificar proteínas mitóticas con un alto valor como dianas en el tratamiento de patologías neoplásicas. En un intento por encontrar fármacos antimitóticos con menor neurotoxicidad, se han desarrollado inhibidores frente a un número importante de reguladores mitóticos. En los primeros ensayos clínicos, los inhibidores frente a la proteína motora quinesina-5 y las quinasas Aurora y Polo han demostrado una menor neurotoxicidad pero también una disminución en la eficacia farmacológica frente a tumores sólidos (Sudakin and Yen 2007).

Las drogas antimitóticas que impiden la dinámica de los microtúbulos provocan una activación del SAC que resulta en una parada del ciclo celular en mitosis (Weaver and Cleveland 2005). Esta detención provoca la muerte por apoptosis de la mayor parte de células. Sin embargo, algunas células tumorales son capaces de escapar de esta parada mitótica y alcanzar la fase G1. Estas células salen de mitosis sin segregar el material genético dando lugar a células tetraploides que, o entran de nuevo en el ciclo celular, o permanecen en un estado de quiescencia que muchas veces finaliza con la muerte de la célula (Gascoigne and Taylor 2008). La salida de mitosis en presencia de un punto de control no satisfecho se produce mediante la destrucción de ciclina B, lo que sugiere que la inhibición del complejo APC/C-Cdc20 por parte del SAC no es completa (Brito and Rieder 2006). Este proceso de adaptación constituye el principal

mecanismo de resistencia de los tumores tratados con fármacos antimitóticos que actúan impidiendo la dinámica de los microtúbulos.

La progresiva degradación de ciclina B como mecanismo de resistencia ha permitido proponer el bloqueo de la salida de mitosis como diana en la terapia contra el cáncer (Huang et al. 2009). Por ello, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que permiten la salida de mitosis en mamíferos permitiría el diseño de una nueva generación de fármacos antineoplásicos.



Objetivos



## Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis ha consistido en estudiar el papel de Cdc20 en el control de la salida de mitosis en mamíferos, así como su posible valor como diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Generación de un modelo de ratón condicionalmente deficiente para Cdc20.
2. Caracterización fenotípica y análisis de viabilidad de los embriones y los ratones deficientes para el cofactor Cdc20.
3. Análisis de la deficiencia de Cdc20 en la progresión del ciclo celular y la mitosis.
4. Estudio de los requerimientos moleculares para la salida de mitosis en mamíferos.
5. Validación de la salida de mitosis como diana terapéutica mediante la eliminación condicional de Cdc20 en tumores.





# Materiales y métodos



## **Materiales y métodos**

### **1. Ratones modificados genéticamente**

Todos los animales modificados genéticamente generados en este estudio se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) atendiendo a la normativa ética y sanitaria provista por la Unión Europea. Todos los experimentos realizados con los ratones fueron aprobados previamente por el comité de bioética y bienestar del Instituto de Salud Carlos III. Los animales fueron observados diariamente y sacrificados cuando presentaron signos obvios de enfermedad. Los ratones modificados genéticamente se mantuvieron en un fondo genético mixto 129/Sv (25%) x CD1 (25%) x C57BL/6J (50%).

#### **1.1. Generación del vector knock-out condicional para Cdc20**

Para generar el vector de targeting knock-out condicional para Cdc20 usamos DNA genómico procedente de células de ratones 129SVJ. De este DNA fueron amplificados los dos brazos de homología y el exón a escindir mediante PCR (PCR, de reacción en cadena de la polimerasa). Los tres productos de PCR fueron clonados en vectores intermediarios pCRII-Zero blunt y pCR4 por el método TOPO (Invitrogen) y fueron secuenciados. A continuación, la secuencia diana fue clonada en el vector pDELBOY en el sitio NruI. Los brazos de homología 3' y 5' se clonaron en los sitios de restricción NotI y Sall respectivamente (Figura 7).

#### **1.2. Generación de las quimeras mutantes para Cdc20**

Una vez diseñado y generado el vector de targeting knock-out condicional para Cdc20, 100 µg del vector fueron microinyectados en células ES de ratón. Los clones recombinantes se seleccionaron en presencia de neomicina y ganciclovir. La identificación de los clones recombinantes positivos se realizó mediante ensayos de hibridación de DNA (Southern Blot).

Para dicho análisis se utilizaron los sitios HindIII externos a la construcción. De un total de 239 clones seleccionados, cuatro de ellos fueron positivos para la recombinación. Uno de los cuatro clones positivos fue microinyectado en blastocistos de ratón de la cepa CD1 y posteriormente implantado en hembras pseudopreñadas para la obtención de los ratones quiméricos.

### **1.3. Análisis de genotipo de los ratones modificados genéticamente**

La determinación del genotipo de los ratones mutantes para Cdc20 se realizó mediante PCR. La PCR fue realizada utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 1 y DNA procedente de la cola del animal.

Las condiciones generales de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización del DNA. Esta fase se continuó de 35 ciclos que incluyeron las siguientes etapas: Desnaturalización: 95°C durante 5 minutos; hibridación: 58°C durante 30 segundos; elongación: 72°C durante 60 segundos. Se finalizó con un ciclo de elongación final de 72°C durante 10 minutos.

### **1.4. Tratamientos y procedimientos realizados en los ratones**

A continuación detallamos el conjunto de procedimientos y tratamientos que han sido realizados en este trabajo utilizando animales mutantes para Cdc20 o animales inmunodeprimidos (SCID). Todos estos procedimientos fueron aprobados para su realización por el comité de ética y bienestar del Instituto de Salud Carlos III.

#### **1.4.1. Tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT)**

La eliminación condicional de Cdc20 en embriones de día E10.5 o E12.5 de desarrollo se realizó mediante la administración intraperitoneal de 4-OHT en la hembra gestante. 5 mg de 4-OHT (98% de riqueza, sigma) fueron disueltos en 300 µl de aceite vegetal e inyectados en una hembra preñada en los días 10.5 y 12.5 de gestación (Perera et al. 2007).

La eliminación condicional de Cdc20 en animales jóvenes y adultos se realizó mediante la alimentación *ad libitum* de los animales con pienso complementado con 4-OHT (Harlan Laboratories Model). Los animales fueron observados diariamente y sacrificados cuando mostraron algún signo obvio de enfermedad.

La eliminación condicional de Cdc20 tanto en los papilomas como en los fibrosarcomas se realizó mediante la administración tópica o intraperitoneal de 4-OHT. En el caso de los papilomas, cada tumor se trató 3 veces por semana con 10 µl de una solución de tamoxifeno a una concentración de 200µg/ml. La eliminación de Cdc20 en fibrosarcomas se realizó mediante la administración intraperitoneal, tres veces por semana, de 1 mg de 4-OHT (98% de riqueza) disuelto en 300 µl de aceite vegetal.

#### **1.4.2. Tratamiento carcinogénico con DMBA/TPA**

Los animales a los 7 días de edad fueron pintados en la espalda con una dosis única de 0,5 mg de 7,12-dimetilbenzantraceno disuelto en acetona. Dos semanas después, el crecimiento tumoral se estimuló tratando a los animales con 5 µg de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) tres veces a la semana durante 12 semanas. Los animales se afeitaron antes de cada aplicación para permitir una mejor distribución del compuesto.

Durante el tratamiento carcinogénico todos los animales fueron observados diariamente y el tamaño y características de las lesiones en la piel fue anotada. El volumen de las lesiones fue determinado 2 veces por semana con la ayuda de un calibre. Cada una de las lesiones fue valorada individualmente, tal y como se expresa en las gráficas expuestas en el apartado de resultados. El volumen del tumor vino dado por la aplicación de la siguiente fórmula:  $V=(d^2 \times D)/2$  donde 'd' es el diámetro menor y 'D' es el mayor.

#### **1.4.3. Inducción de la proliferación en las células progenitoras del folículo piloso**

Animales de 50-55 días de edad, momento en el cual el pelo se encuentra en la fase denominada telogen, se trataron tópicamente con una sola dosis de 100µg 4-OHT. Ocho días después de esta única dosis de 4-OHT, el pelo se arrancó manualmente para inducir la entrada

en ciclo celular de las células progenitoras del folículo piloso. Dos semanas después de la depilación, los animales fueron sacrificados para analizar histológicamente la piel (Ruzankina et al. 2007).

#### **1.4.4. Tratamientos con drogas antimitóticas**

Animales inmunodeprimidos de 6 semanas de edad (Charles Rivers) fueron inyectados con fibroblastos embrionarios de ratón transformados con los oncogenes H-Ras V12 y E1A. Un total de  $5 \times 10^5$  células se inyectaron en cada flanco del ratón para conseguir la inducción eficiente de fibrosarcomas agresivos. Una vez los tumores alcanzaron un volumen de  $200 \text{ mm}^3$  iniciamos el tratamiento con 4-OHT, taxol, vincristina y el inhibidor de PIK1 (BI2536). Las siguientes dosis de drogas fueron administradas intraperitonealmente tres veces por semana: 1 mg de 4-hidroxitamoxifeno, paclitaxel 12 mg/kg, vincristina 0,375 mg/kg y BI2536 35 mg/kg. Los animales se observaron diariamente y el volumen de los tumores se determinó cada 2 días con la ayuda de un calibre. Los animales se sacrificaron por motivos éticos cuando los tumores alcanzaron un volumen de  $1500 \text{ mm}^3$  (Koyanagi et al. 1994; Steegmaier et al. 2007)

#### **1.5. Análisis histológico e inmunohistoquímico**

Las muestras de tejidos destinadas a su análisis histológico o inmunohistoquímico se mantuvieron para su fijación durante 24 horas en una solución de formalina (Sigma). Las muestras fueron procesadas en parafina (Panreac) y se realizaron cortes de  $5 \mu\text{m}$  de grosor con ayuda de un micrótopo (Leica). Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina y se analizaron al microscopio con la ayuda de la Dra. Marta Cañamero. Otras secciones fueron analizadas mediante tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos detallados en la Tabla 2.

### **2. Embriones**

Hembras de ratón (de 5 semanas de edad) fueron superovuladas por la inyección secuencial (intervalo de 48 horas) e intraperitoneal de la gonadotropina coriónica equina (PMSG) y la gonadotropina coriónica humana (hCG). Una vez inyectada la última hormona, las hembras

fueron puestas en cruce con machos con el genotipo de interés. 48 horas después de poner el cruce, se extrajeron los embriones de día E1.5 de desarrollo del oviducto de las hembras preñadas. Los embriones se lavaron en tres ocasiones en medio Hepes-buffer Medio M2 (M2; Sigma) para posteriormente ser transferidos a medio KSOM (Chemicon International Inc.) donde fueron cultivados a 37°C y con 5% CO<sub>2</sub>. Los embriones se fotografiaron diariamente durante 3 días.

### **2.1. Inmunofluorescencia de embriones**

Los embriones de diferentes estadios de desarrollo se fijaron con metanol frío durante 1 hora a -20°C. Una vez fijados y antes de ser permeabilizados con Triton X-100 al 0,1% en PBS, los embriones fueron lavados con medio M2 y PBS con BSA al 0,1% (Sigma). Los embriones se bloquearon con BSA al 3% en PBS y se incubaron con los siguientes anticuerpos: ACA (anticentrómero),  $\alpha$ -tubulina, ciclina B (Tabla 2). La tinción del DNA se realizó con DAPI. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP5-AOBS-UV).

### **3. Cultivos celulares**

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, de mouse embryonic fibroblast) fueron obtenidos a partir de embriones de día E13.5-E14.5 de desarrollo. Los embriones fueron aislados del útero y del saco vitelino. Una vez eliminada la cabeza y el hígado, el resto del embrión se cortó lo más finamente posible con ayuda de unas tijeras y se dispersó con 3 ml de una solución de tripsina-EDTA (tripsina 0,5 g/L, EDTA 0,2 g/L, NaCl 0,85 g/L). La suspensión de células procedentes de cada embrión se sembró en una placa de cultivo de 150 mm de diámetro. Cuando los fibroblastos alcanzaron el 70% de confluencia (2-3 días) se recogieron las células y se congelaron alícuotas en N<sub>2</sub> líquido. Se consideró como pase 2 de estas células el momento de ponerlas en cultivo una vez descongeladas.

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en medio DMEM (GIBCO) complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, de fetal bovine serum) y un cóctel

antibiótico (estreptomycin y penicilina). Las células fueron crecidas en incubadores a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.1. Infecciones y ensayos con RNA de interferencia

Los fibroblastos embrionarios de ratón fueron transducidos con adenovirus (100 MOI) que expresan la recombinasa Cre o la proteína GFP (Universidad de Iowa). Los MEFs se infectaron cuando presentaron una confluencia máxima en placas de 100 mm de diámetro. 48 horas después de la infección, las células se sembraron a baja densidad para su posterior análisis.

La eliminación parcial mediante RNA de interferencia se realizó utilizando oligonucleótidos específicos frente a los mensajeros indicados (Dharmacon). Los fibroblastos se nucleofectaron (amaxa) con 2 µg de los oligonucleótidos. La nucleofección se realizó en el momento en el que los fibroblastos fueron levantados para ser sembrados a baja densidad y se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del proveedor. La eficiencia de silenciamiento obtenida con los oligonucleótidos fue testada mediante Western Blot.

### 3.2. Citometría de flujo

Para el análisis mediante citometría de flujo, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS durante 3 minutos. Una vez lavadas con PBS, las células fueron permeabilizadas en etanol al 70%. Tras el bloqueo con BSA al 3% en PBS, la inmunodetección se realizó utilizando los anticuerpos detallados en la Tabla 2.

La detección de EdU y annexina V se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (Annexin V-APC Apoptosis detection kit, BD Pharmingen) (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 flow cytometry assay kit, Molecular Probes, Invitrogen). Los datos generados por el citómetro de flujo (FACS Canto) fueron procesados usando el software FACSDiva (Becton Dickinson).



### 3.3. Transformación celular por oncogenes y videomicroscopía

Para la transformación celular de fibroblastos se cultivaron los MEFs primarios en pase 2 o 3 hasta el 70% de confluencia en placas de 100 mm de diámetro. La transfección se realizó mediante el método de fosfato cálcico (Wigler et al. 1977) con los vectores de expresión p-babe-H-Ras V12 y pCMV-E1A.

Después de 8 horas de incubación a 37°C, las células se lavaron con EDTA y se añadió medio nuevo. Las células se incubaron durante 3 semanas, cambiando el medio cada 3 días y, pasado ese tiempo las placas se utilizaron para obtener clones aislados. Los focos transformados se aislaron en placas individuales y se expandieron.

Los fibroblastos transformados fueron analizados por videomicroscopía. Las células se cultivaron hasta alcanzar un 40% de confluencia en placas de fondo de cristal. Con esta confluencia, los fibroblastos se trataron con las diferentes drogas durante 96 horas (Tabla 3). La filmación comenzó 24 horas después del inicio del tratamiento y se prolongó durante 3 días. El análisis se realizó con el microscopio de deconvolución Deltavision.

## 4. Procedimientos bioquímicos

A continuación exponemos detalladamente el conjunto de procedimientos bioquímicos que han sido realizados durante este estudio y que han sido incluidos en esta memoria de tesis doctoral.

### 4.1. Western Blot, inmunoprecipitación y ensayos de actividad quinasa

Para la extracción de proteínas de las células cultivadas, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en una solución que contenía 37mM NaCl, 0,5% NP-40, 0,1% SDS, 1% TX-100, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 10% glicerol, 0,5mM de DTT y una mezcla comercial de inhibidores de fosfatasas y proteasas (Sigma). Para la inmunoprecipitación, los lisados celulares se incubaron con 5 µg de anticuerpo anti-Cdk1 (Santa Cruz Biotechnology) o 5 µg de anticuerpo anti-V5 (Invitrogen) durante 1 hora y después con 200 µl de esferas de sefarosa recubiertas de proteína A (Amersham) en agitación a 4°C durante 2 horas. El ensayo quinasa de

Cdk1 se realizó utilizando como sustrato 1 µg de histona H1 (Roche Biochemicals) por reacción. Los ensayos quinasas se realizaron en una solución que contenía 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0,5 mM ditioneitol (DTT), 25 µM ATP y 10 mCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 30 minutos y las reacciones se pararon añadiendo el tampón de carga (100 mM Tris HCl, pH 6.8; 4% SDS; 0,1% azul de bromofenol; 10% glicerol; 200 mM DTT). Las muestras se corrieron en un gel de SDS-PAGE al 12% que se tiñó con azul de Coomassie. La cuantificación de las proteínas fosforiladas se realizó en un analizador de radioactividad Storm 850 (Molecular Dynamics)

En el caso de los western blots, las proteínas fueron separadas en geles Criterion Bis-Tris (BioRad). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad), mediante transferencia húmeda, utilizando el aparato Trans-Blot de BioRad. Estas membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05% y se sometieron a inmunodetección usando los anticuerpos que se detallan en la Tabla 2.

## 4.2. Extendido cromosómico

Las células reciben un tratamiento hipotónico durante 5 minutos con una mezcla de 40% DMEM / 60% agua. El tratamiento hipotónico se interrumpió añadiendo a la suspensión celular un volumen idéntico de solución de Carnoy (75% metanol puro, 25% ácido acético glacial). Tras la centrifugación, las células fueron resuspendidas y fijadas con la misma solución de metanol y ácido acético durante 10 minutos. Una vez fijadas, las células se lanzaron sobre el portaobjetos desde una altura de 5-10 cm. Finalmente, las muestras se tiñeron con una solución de Giemsa al 5% durante 7 minutos.

## 4.3. Inmunofluorescencia

Los fibroblastos embrionarios de ratón cultivados sobre cristales fueron fijados con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 7 minutos a 37°C, permeabilizados con tritón X-100 al 0,15% en PBS durante 2 minutos a 37°C y bloqueados con BSA al 1% en PBS durante 1 hora. La inmunofluorescencia se realizó utilizando los anticuerpos específicos que se detallan en la Tabla 2. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos Alexa

488, Alexa 594 y Alexa 647. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP5-AOBS-UV).

#### 4.4. Ensayos de degradación

Los ensayos de degradación de sustratos por los complejos APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1 se realizaron bajo colaboración con el laboratorio del Dr. Yamano. Las proteínas recombinantes marcadas con  $^{35}\text{S}$  metionina fueron obtenidas tras su transcripción-traducción in vitro en presencia del aminoácido marcado radioactivamente. Las proteínas recombinantes resultantes se añadieron a extractos de oocitos de *Xenopus laevis*. Tras la activación del complejo APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1 mediante la adición al extracto de  $\text{Ca}^{2+}$  se tomaron muestras a diferentes tiempos para su posterior análisis por western blot (Yamano et al. 1996).

#### 5. Reactivos

A continuación se detallan en tablas los reactivos que han sido empleados para la realización de los experimentos que se exponen en esta memoria de tesis doctoral.

Tabla 1. Análisis de genotipo			
Alelo	Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño
Cdc20 (+)	Fwend1	GATTTGCACTCACTGCTTCAACTGG	554 pb
	Ex3Rv	CTTTCTGCTCCTGAAATACACG	
Cdc20 (lox)	Fwend1	GATTTGCACTCACTGCTTCAACTGG	636 pb
	Ex3Rv	CTTTCTGCTCCTGAAATACACG	
Cdc20 (-)	Fwend1	GATTTGCACTCACTGCTTCAACTGG	324 pb
	Ex3Rv	CTTTCTGCTCCTGAAATACACG	
Securin (+)	FloxFw	TGCCCTCTCCACTCTGGATGTTGA	630 pb
	FloxRv	TTGGGGAACGAACCCTACTGTAAG	
Securin (lox)	FloxFw	TGCCCTCTCCACTCTGGATGTTGA	700 pb
	FloxRv	TTGGGGAACGAACCCTACTGTAAG	
Securin (-)	KOFw	TCAGGACAACCTCCAGGAGTCCAT	435 pb
	KORv	TTGGGGAACGAACCCTACTGTAAG	
p53 (+)	p53Fw	TGGTTTGTGCGTCTTAGAGACAGT	480 pb
	p53Rv	AAGGATAGGTCGGCGGTTTCAT	
	p53KO	CCAGCTCATTCTCCCACTCA	
p53 (-)	p53Fw	TGGTTTGTGCGTCTTAGAGACAGT	330 pb
	p53Rv	AAGGATAGGTCGGCGGTTTCAT	
	p53KO	CCAGCTCATTCTCCCACTCA	

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados				
Antígeno	Tipo	Aplicación	Dilución	Origen
Centrómeros	Humano	IF	1:200	Antbodies incorporated
$\alpha$ -actina	Ratón	WB	1:2000	Sigma
$\alpha$ -tubulina	Ratón	IF, WB	1:2000	Sigma
Bromo-deoxiuridina	Ratón	IHQ	1:50	GE Healthcare
B55 $\alpha$	Ratón	WB	1:500	Santa Cruz biotech.
Caspasa-3-activa	Conejo	IHQ	1:200	RYD systems
Cdc20	Conejo	WB	1:200	Santa Cruz biotech.
Cdk1	Ratón	WB	1:500	Santa Cruz biotech.
Ciclina B1	Ratón	IHQ	1:175	Millipore
Ciclina B1	Ratón	WB	1:1000	Chemicon International
Ciclina B1	Conejo	IF	1:200	Santa Cruz biotech.
Ciclina A2	Conejo	WB	1:250	Santa Cruz biotech.
Fosfo-histona H3	Conejo	IF, IHQ	1:250	Millipore
Fosfo-histona H3	Conejo	FACS	1:100	Millipore
Fosfo-Cdk-sustratos	Conejo	WB	1:750	Upstate Biotechnology
Ki67	Rata	IHQ	1:100	GE Healthcare
Mad2	Ratón	WB	1:200	MBL
Mastl	Conejo	WB	1:100	Abcam
MPM2	Ratón	FACS	1:100	Upstate Biotechnology
p21Cip1	Conejo	WB	1:250	Santa Cruz biotech.
Ppp1r1a	Conejo	WB	1:250	Abcam
Securin	Ratón	WB	1:1000	Santa Cruz biotech.

IHQ: inmunohistoquímica; WB: western blot; IF: inmunofluorescencia; FACS: Citometría de flujo

Tabla 3. Inhibidores utilizados			
Nombre	Diana	Concentración	Origen
Ácido okadaico	PP2A	0,5 $\mu$ M	Calbiochem
BI2536	PIk1	100 nM	Selleck chemicals
GW843682X	PIk1	10-100 $\mu$ M	Tocris
MG132	Proteosoma	20 $\mu$ M	Sigma
Monastrol	Eg5	100 $\mu$ M	Sigma
Nocodazol	Microtúbulos	0,3318 $\mu$ M	Sigma
Purvalanol A	Cdk1	20-50 $\mu$ M	Calbiochem
Roscovitina	Cdk1	20-200 $\mu$ M	Sigma
Staurosporina	Quinasas	0,1-10 $\mu$ M	Sigma
Taxol	Microtúbulos	200 nM	Sigma
Vincristina	Microtúbulos	1 $\mu$ M	Sigma
ZM447439	Aurora B	10-100 $\mu$ M	Tocris

# Resultados

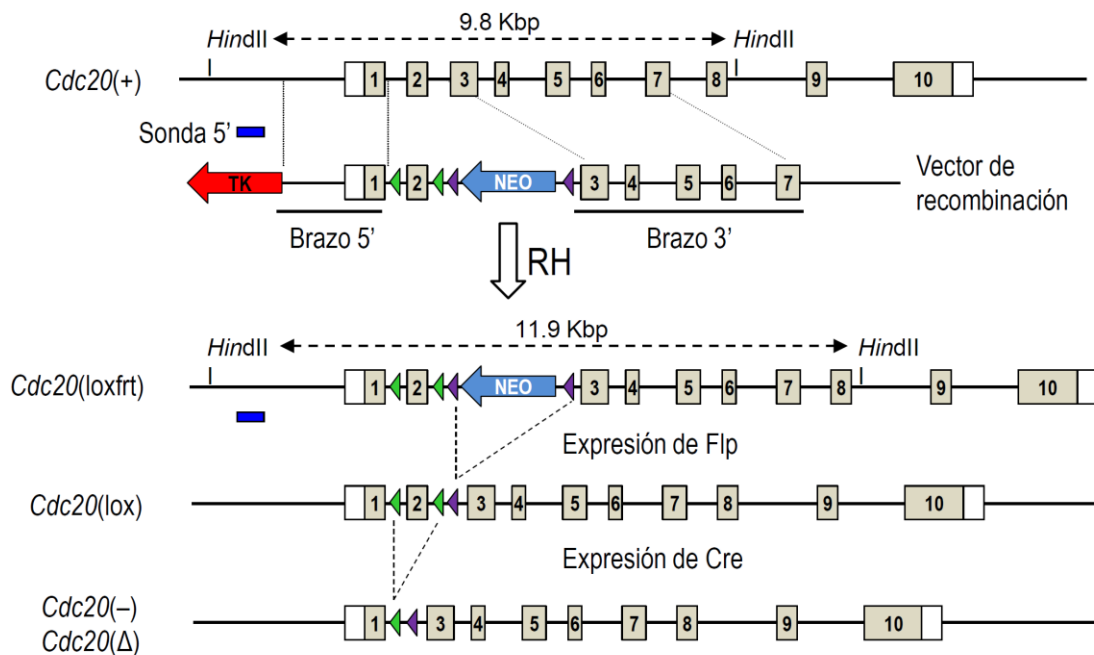
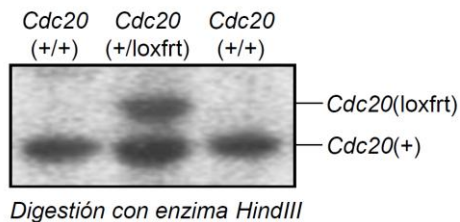


## Resultados

### 1. Generación de un ratón condicionalmente deficiente para *Cdc20*

La generación de una mutación condicionalmente deficiente para el gen *Cdc20* de ratón fue llevada a cabo mediante recombinación homóloga en células madres embrionarias de ratón o células ES (ES, de Embryonic Stem Cells). Para ello, generamos un vector de recombinación en el que incorporamos la secuencia del gen que queríamos eliminar (exón 2) flanqueada por dos secuencias loxP, un cassette PGK-Neo (resistente a Neomicina) flanqueado por dos secuencias frt y dos brazos de homología a ambos lados de la secuencia diana (Figura 7a). Este vector recombinante fue electroporado en células ES. Los clones en los que hubo recombinación homóloga entre los brazos del vector y el gen de interés fueron identificados por Southern Blot (Figura 7b). De un total de 239 clones analizados 4 de ellos resultaron ser positivos para la mutación. Uno de estos clones fue microinyectado en blastocistos de ratón de la cepa CD1. Los blastocistos microinyectados fueron implantados en hembras pseudopreñadas que dieron lugar a los denominados ratones quiméricos. Las quimeras obtenidas fueron cruzadas con ratones de genotipo salvaje o WT (WT, de wild type) para la generación de ratones heterocigotos para la mutación [*Cdc20*(+/*loxfrt*)].

La estrategia genética utilizada para la generación del ratón condicionalmente deficiente para *Cdc20* se basó en los sistemas de escisión por las recombinasas específicas Cre-loxP y Flp-frt. Así, el cruce de ratones heterocigotos para la mutación con ratones transgénicos para la recombinasa Flp resultó en animales heterocigotos para el alelo lox [*Cdc20*(+/*lox*)]. El alelo lox es funcionalmente idéntico al alelo WT, únicamente se diferencia en la presencia de dos secuencias loxP que flanquean la secuencia diana. De esta manera, el cruce de los ratones *Cdc20*(+/*lox*) con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre resultó en animales heterocigotos para el gen *Cdc20* [*Cdc20*(+/-)] (Figura 7a).

**a****b**

**Figura 7. Estrategia de targeting para la eliminación condicional del gen *Cdc20*.** (a). Representación esquemática de los alelos generados.

Tras la recombinación homóloga entre el locus de *Cdc20* de ratón y el vector de recombinación se obtuvieron los clones portadores de la mutación. El marcador de selección PGK-neo en el alelo loxfrt queda flanqueado por dos sitios Frt que son reconocidos por la recombinasa Flp y da lugar al alelo lox. Después de expresar la recombinasa Cre, el exón 2

flanqueado por los sitios loxP es eliminado dando lugar al alelo nulo. (b). Southern blot para la identificación de los clones recombinantes. El marcaje se realizó con la sonda a, observándose una banda de 11,9 Kbp correspondiente a la banda recombinante del clon positivo.

## 2. Caracterización fenotípica del ratón deficiente para *Cdc20*

Muchos han sido los modelos murinos deficientes para diferentes reguladores mitóticos que han sido generados hasta el momento. El fenotipo principal de estos modelos genéticos ha variado mucho en función del papel que dicho gen tiene en la regulación de la mitosis. Sin embargo, una característica común a muchos de ellos es la letalidad embrionaria temprana. Este es el caso del modelo knock-out para ciclina B1, el principal regulador de la actividad quinasa de



Cdk1. El ratón deficiente para ciclina B1 muere en estadios anteriores a día E14.5 (Brandeis et al. 1998). Estudios realizados en nuestro laboratorio sugieren que la muerte del embrión se produce en estadio de cuatro células de desarrollo embrionario (datos no mostrados). De igual manera, ratones deficientes para algunos de los genes reguladores del SAC, tales como Mad2 y BubR1, han resultado también en una letalidad embrionaria temprana (Dobles et al. 2000; Wang et al. 2004).

Dada la importancia del complejo APC/C y sus coactivadores como reguladores proteolíticos de la mitosis se han generado recientemente varios modelos genéticos de ratón para alguna de las subunidades de este complejo. Mientras el modelo knock-out para la subunidad Apc2 resulta en una letalidad embrionaria en estadio E6.5 de desarrollo (Wirth et al. 2006), los ratones deficientes para el coactivador Cdh1 alcanzan el nacimiento cuando la eliminación del gen se produce únicamente en el embrión y no afecta a la placenta materna (Garcia-Higuera et al. 2008). Este resultado sugiere una posible compensación funcional entre Cdc20 y Cdh1, compensación que también ha sido vista en estudios bioquímicos *in vitro*.

## 2.1. Letalidad embrionaria temprana en el ratón deficiente para Cdc20

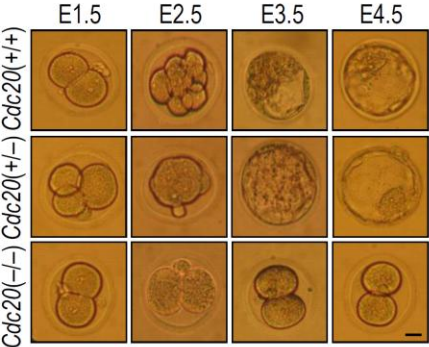
Para estudiar la viabilidad de los ratones deficientes para Cdc20 cruzamos animales Cdc20(+/-) y analizamos la descendencia. Tras el genotipado de 87 crías mediante PCR pudimos comprobar que ninguna de ellas era deficiente para dicho gen (Figura 8a). Este resultado sugiere que la falta de Cdc20, al igual que la de otros muchos reguladores del ciclo celular, conduce a la muerte del ratón durante el desarrollo embrionario. Con el objetivo de determinar el momento exacto del desarrollo en el que la ausencia de Cdc20 resulta letal, extrajimos embriones a diferentes estadios del desarrollo. Ninguno de los 35 embriones analizados entre día E10.5 y E14.5 de desarrollo resultó ser deficiente para Cdc20. Este dato nos llevó a analizar embriones en los primeros estadios del desarrollo. Para ello, los embriones extraídos a día E1.5 fueron cultivados *in vitro* hasta alcanzar el estadio de blastocisto (E3.5-E4.5). Una vez más, ninguno de los blastocistos resultó ser un embrión knock-out para Cdc20. Sin embargo, el cultivo *in vitro* de los embriones nos permitió observar como un porcentaje de estos fallaban en su desarrollo y permanecían parados en un estadio de dos células (Figura 8b). El análisis por PCR confirmó que los embriones parados en este estadio de desarrollo eran los embriones deficientes para el cofactor (Figura 8c). Este resultado avala la idea de que la

ausencia de Cdc20 durante el desarrollo embrionario no puede ser compensada funcionalmente por Cdh1. Sin embargo, dado que Cdh1 es requerido principalmente durante la fase G1 y que las primeras divisiones celulares de la embriogénesis carecen de esta fase, es posible pensar que Cdh1 no se exprese hasta estadios más tardíos del desarrollo. Por tanto, no podemos descartar que Cdh1 pueda sustituir funcionalmente a Cdc20 en ciclos celulares completos.

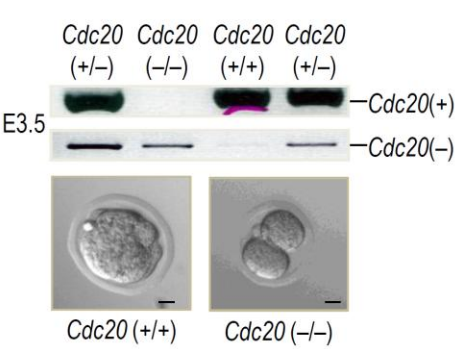
**a**

Análisis de viabilidad del ratón deficiente para Cdc20				
Cruces <i>Cdc20</i> (+/-) x <i>Cdc20</i> (+/-)				
	Genotipo			Total
	<i>Cdc20</i> (+/+)	<i>Cdc20</i> (+/-)	<i>Cdc20</i> (-/-)	
Animales Nacidos	33	54	0	87
Embriones E10.5 - E14.5	10	25	0	35
Embriones. Blastocisto	5	18	0	23
Embriones. Estadio 2 células	10	19	16	45

**b**



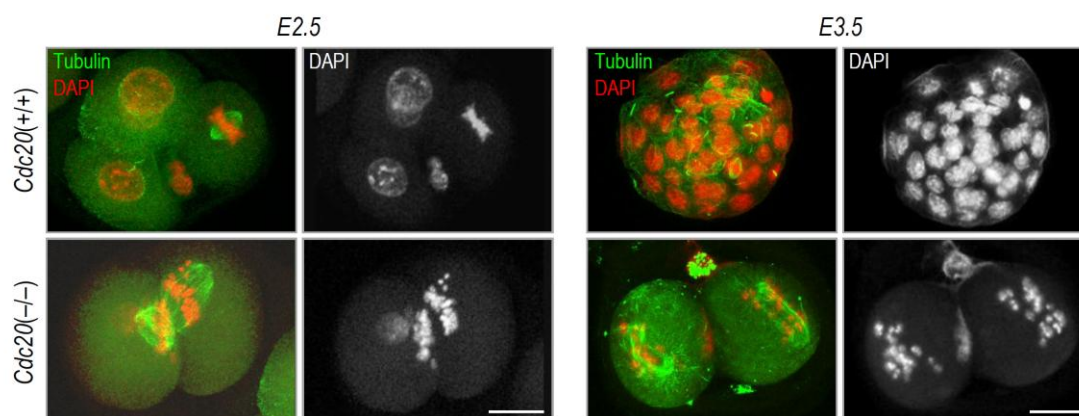
**c**



**Figura 8. Letalidad embrionaria en ausencia de Cdc20.** (a). Análisis de viabilidad de ratones y embriones deficientes para Cdc20. Los embriones deficientes para Cdc20 están presentes en estadio de dos células pero nunca progresan en el desarrollo embrionario. (b). Los embriones knock-out para Cdc20 permanecen parados en estadio de dos células mientras que los embriones *Cdc20*(+/+) y *Cdc20*(+/-) progresan hasta alcanzar el estadio de blastocisto en el día E3.5-4.5 de desarrollo. Escala, 10µM. (c). Genotipado representativo de los alelos deficientes y salvajes para Cdc20 mediante PCR. Los mismos oligonucleótidos fueron usados para el genotipado de embriones salvajes de día E4.5 y embriones deficientes para Cdc20. Escala, 10µM.

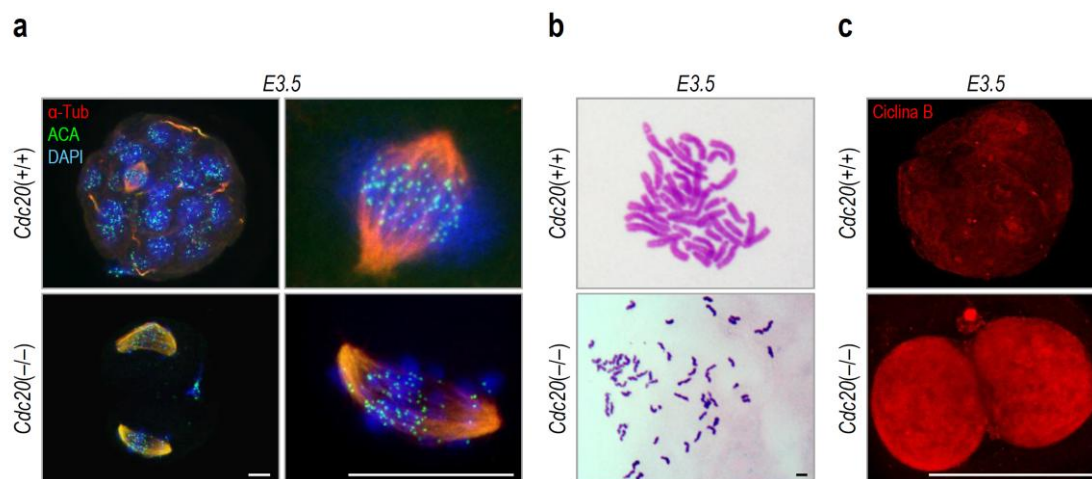
## 2.2. La ablación genética de Cdc20 provoca parada en metafase

La explicación más simple a la parada en estadio de dos células de los embriones knock-out para Cdc20 es la imposibilidad de estos embriones para finalizar la división celular. Con el objetivo de profundizar en las causas que provocan esta letalidad embrionaria temprana, analizamos los embriones deficientes para Cdc20 mediante inmunofluorescencia. Los embriones fueron extraídos a día E1.5 postcoito y cultivados *in vitro* para su posterior análisis a día E2.5. El análisis por inmunofluorescencia reveló que, mientras los embriones *Cdc20*(+/+) habían progresado hasta un estadio de cuatro células donde la mayor parte de ellas se encontraban en interfase, los embriones *Cdc20*(-/-) permanecían parados en metafase (Figura 9). Para valorar si esta parada en metafase se trataba de una detención permanente en mitosis, analizamos los embriones deficientes para este cofactor a día E3.5. La inmunofluorescencia de los embriones *Cdc20*(-/-) en este estadio de desarrollo reveló la presencia de figuras mitóticas aberrantes. En estas conformaciones mitóticas anómalas, el huso presentaba una mayor elongación y los cromosomas habían perdido su disposición ordenada en la placa metafásica (Figura 9).



**Figura 9. Cdc20 es esencial para el inicio de la anafase y la salida de mitosis en embriones de dos células.** El análisis por inmunofluorescencia de los embriones E2.5 revela mórulas *Cdc20*(+/+) con células mitóticas normales. Los embriones *Cdc20*(-/-) permanecen parados en estadio de dos células mostrando figuras mitóticas en metafase. La inmunofluorescencia de los embriones E3.5 muestra blastocistos *Cdc20*(+/+) normales y embriones *Cdc20*(-/-) con mitosis aberrantes donde los cromosomas se encuentran distribuidos a lo largo de un huso mitótico anormalmente elongado. DNA, rojo;  $\alpha$ -tubulina, verde. Escala, 10  $\mu$ M.

Quisimos saber si las cromátidas hermanas permanecían aún cohesionadas en los embriones *Cdc20*<sup>(-/-)</sup> de día E3.5 de desarrollo. Para ello, realizamos un análisis detallado mediante inmunofluorescencia y mediante extendido cromosómico. El conteo del número de cromosomas y la tinción centromérica nos permitieron confirmar la separación de los cromosomas duplicados en las mitosis aberrantes (Figura 10a y 10b). Dado que *Cdc20* ha sido postulado como el principal efector en la separación de las cromátidas hermanas durante la transición metafase-anafase, la pérdida de la cohesión cromosómica en ausencia de este cofactor constituye un resultado sorprendente. La explicación más sencilla a esta observación es la posible fatiga en la cohesión de los cromosomas tras la parada prolongada en metafase. No obstante, no podemos descartar que otros mecanismos hayan podido participar en este proceso. A pesar de que la separación de las cromátidas hermanas constituye un evento principal en la salida de la fase M, ninguno de los embriones *Cdc20*<sup>(-/-)</sup> consiguió salir de mitosis y progresar más allá de un estadio embrionario de dos células. El impedimento en la salida de mitosis se entiende por los altos niveles de ciclina B observados en los embriones *Cdc20*<sup>(-/-)</sup>. Estos niveles de ciclina B presumiblemente impiden la inactivación de Cdk1 y la progresión normal del desarrollo embrionario (Figura 10c).



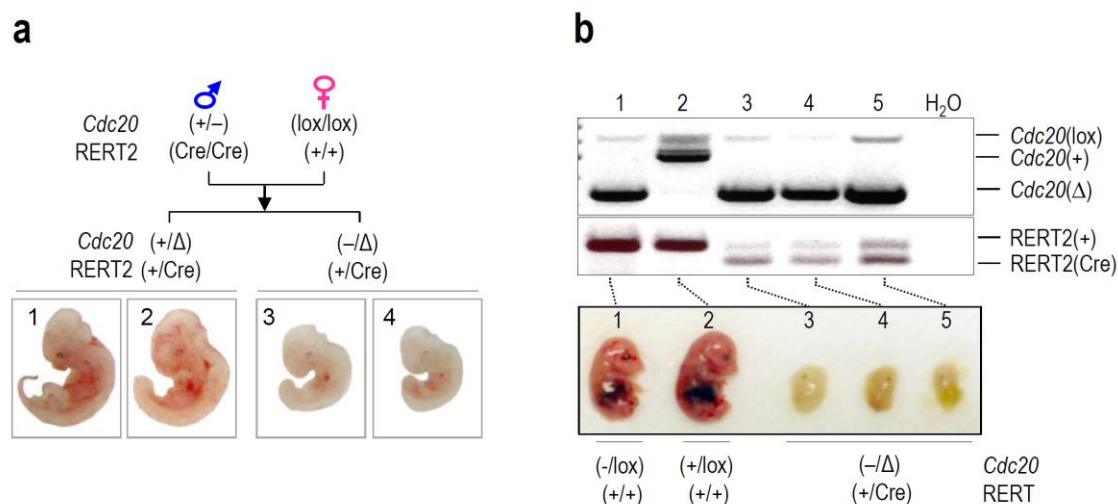
**Figura 10. Pérdida de cohesión cromosómica en los embriones *Cdc20* knock-out 48 horas después de la parada en mitosis.** (a). Análisis por inmunofluorescencia de embriones E3.5 muestran figuras mitóticas aberrantes con separación de cromátidas en embriones deficientes para *Cdc20*. Azul, DNA; Rojo,  $\alpha$ -tubulina; Verde, centrómeros, ACA. Escala, 10 $\mu$ M. (b). Imágenes representativas de un extendido de cromosomas en el que apreciamos una normal cohesión cromosómica en los embriones *Cdc20*<sup>(+/+)</sup> y la pérdida de la cohesión centromérica en los cromosomas de los embriones *Cdc20*<sup>(-/-)</sup>. Escala, 2 $\mu$ M (c). Los embriones deficientes para *Cdc20* presentan elevados niveles de ciclina B en relación con los detectados por inmunofluorescencia en embriones *Cdc20*<sup>(+/+)</sup>. Rojo, ciclina B. Escala, 10 $\mu$ M.

### 3. Efecto de la eliminación condicional de Cdc20 en el ratón

La eliminación genética de Cdc20 en los estadios iniciales de la embriogénesis indica el absoluto requerimiento de Cdc20 en la ejecución de las primeras divisiones celulares del desarrollo. Sin embargo, dadas las características particulares de los primeros ciclos celulares embrionarios, creímos pertinente analizar el requerimiento de Cdc20 en estadios postimplantacionales del desarrollo y en individuos adultos.

#### 3.1. Cdc20 es esencial en estadios tardíos del desarrollo embrionario

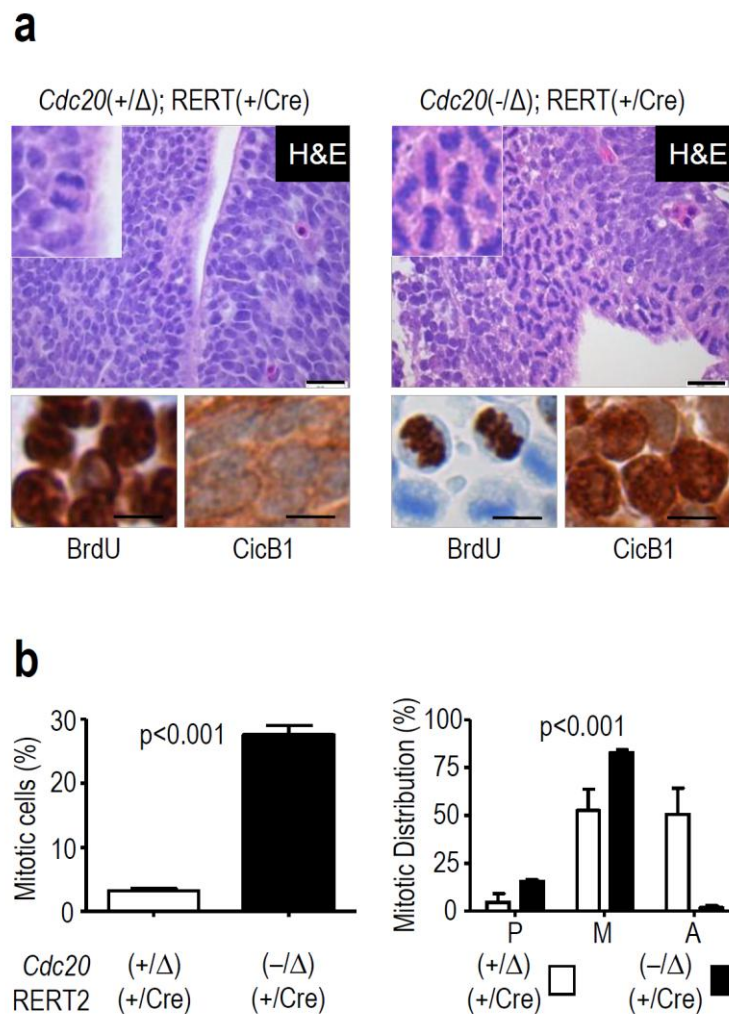
Para la eliminación condicional de Cdc20 *in vivo* hicimos uso del alelo condicional previamente generado [(Cdc20(lox)]. En estos animales, una forma inducible por tamoxifeno de la recombinasa Cre (Cre-RERT2) (Guerra et al. 2003) fue expresada bajo el promotor del gen de la RNA polimerasa II (Alelo RERT).



**Figura 11. Parada del desarrollo embrionario de ratón por la eliminación condicional de Cdc20.** Hembras de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-) fueron cruzadas con machos de genotipo *Cdc20*(-/lox); RERT(+/-) e inyectadas con 4-OHT a día 10.5 o 12.5 de gestación. (a). Los embriones de genotipo *Cdc20*(-/-Δ); RERT(+/-) extraídos 24 horas después de la inducción de la recombinasa Cre a día E10.5 mostraron una drástica parada del desarrollo embrionario. (b). La eliminación genética de Cdc20 en embriones de día E12.5 de desarrollo provoca la pérdida de proliferación y la muerte del embrión en tan solo 48 horas.



Con el objetivo de analizar el requerimiento de *Cdc20* en estadios tardíos del desarrollo embrionario, inyectamos 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) en hembras preñadas que se encontraban en día 10.5 (Figura 11a) o 12.5 de gestación (Figura 11b). El 4-OHT indujo la expresión de la recombinasa Cre que permitió la escisión del exón 2 dando lugar al alelo knock-out [Alelo *Cdc20*( $\Delta$ )]. Aquellos embriones de genotipo *Cdc20*( $-\Delta$ ); RERT(+/*Cre*), que heredaron un alelo *Cdc20*(-) del padre y un alelo *Cdc20*(lox) de madre, mostraron una drástica parada del desarrollo embrionario 24 o 48 horas después de la inducción de la recombinasa. El análisis histológico detallado de los embriones de genotipo *Cdc20*( $-\Delta$ ); RERT(+/*Cre*) reveló una importante pérdida de proliferación en todos los tejidos proliferativos. Esta pérdida de proliferación se caracterizó por la masiva presencia de figuras mitóticas en metafase y los altos niveles de ciclina B (Figura 12).



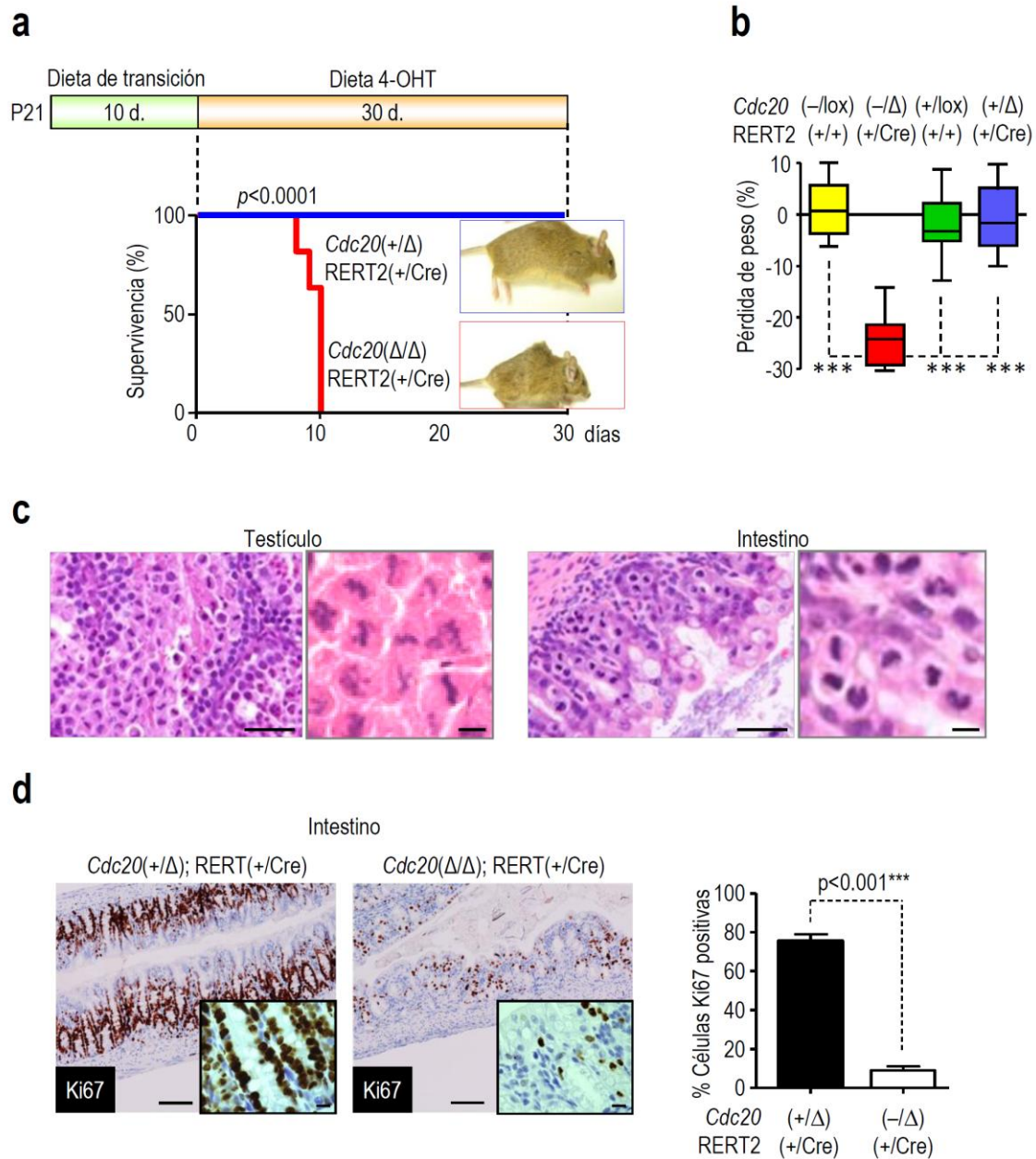
**Figura 12. *Cdc20* es esencial para iniciar la anafase en células embrionarias de ratón.** (a). La mayor parte de las células en los embriones control [*Cdc20*(+/ $\Delta$ ); RERT(+/*Cre*)] se encuentran en interfase. Sin embargo, alguna

figura mitótica puede ser observada en tejidos proliferativos como el neuroepitelio (H&E; hematoxilina y eosina). Los embriones deficientes para *Cdc20* presentan una enorme acumulación de células en metafase con altos niveles de ciclina B. Algunas metafases son positivas para BrdU tras un pulso con este marcador 6 horas antes de la extracción de los embriones. No obstante, la mayor parte de las metafases son negativas para BrdU, lo que indica que estas células han permanecido paradas en metafase durante un tiempo mayor a 6 horas. Escala, 20µM (H&E) o 10µM (IHQ). (b). Determinación del índice mitótico (por H&E) y representación gráfica de la distribución de las células mitóticas en prometafase (PM), metafase (M) o anafase (A) de los embriones con el genotipo indicado. El análisis estadístico fue realizado usando el Test de Fisher tras la cuantificación de 500 células de cada genotipo.

### 3.2. *Cdc20* es un gen esencial en el ratón adulto

Dado el papel esencial de *Cdc20* en diferentes estadios del desarrollo embrionario, quisimos investigar el requerimiento de este cofactor en etapas post-embrionarias en las que la tasa de proliferación tisular fuese menor. Para ello, alimentamos ratones recién destetados (3 semanas de edad) de genotipo *Cdc20*(-/-lox); RERT(+/-Cre) y animales control portando el alelo *Cdc20*(+) o no portando el alelo RERT(Cre) con una dieta complementada con 4-OHT. Este tratamiento no supuso ninguna alteración en la viabilidad de los animales control. Sin embargo, todos los ratones en los que se eliminó genéticamente *Cdc20* murieron entre 8-10 días después del inicio del tratamiento (Figura 13a). Esta muerte estuvo asociada a la drástica pérdida de peso que experimentaron los animales deficientes para *Cdc20* y no así los animales control (Figura 13b).

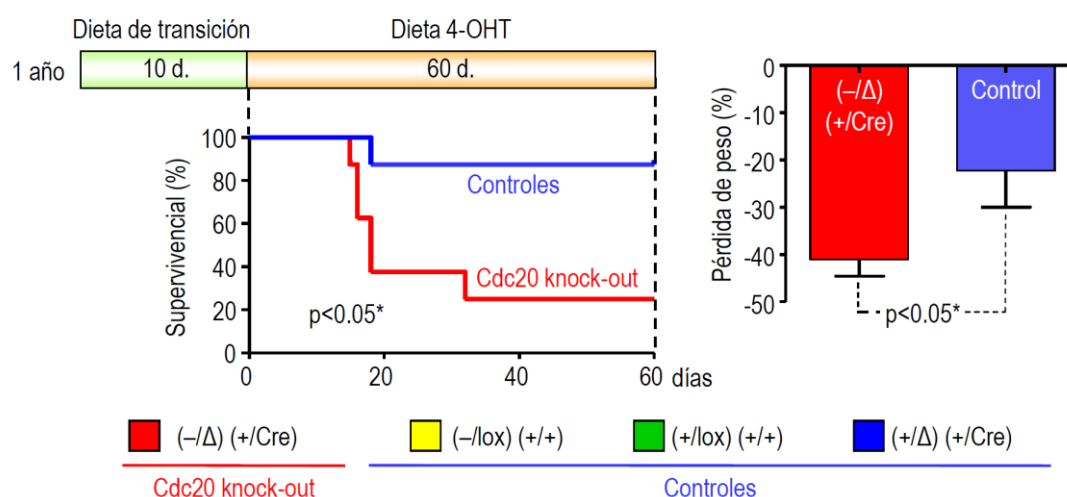
La eliminación condicional de *Cdc20* en animales jóvenes resultó en diversas anomalías histológicas que afectaron fundamentalmente a los tejidos proliferativos. Así, tejidos como el intestino, el testículo etc. presentaron una acumulación masiva de células en metafase y una pérdida de su capacidad proliferativa (Figura 13c). Este resultado sugiere el requerimiento in vivo de *Cdc20* para todas aquellas células que se encuentran dentro del programa de proliferación (Figura 13d). El fenotipo observado en el epitelio intestinal tras la eliminación de *Cdc20* apunta a los problemas en la absorción de nutrientes como la principal causa de muerte del ratón *Cdc20*(-/-Δ); RERT(+/-Cre).



**Figura 13. *Cdc20* es necesario para la homeostasis tisular en ratones jóvenes.** (a). Ratones jóvenes (P21) fueron alimentados con comida complementada con 4-OHT (n=15, por cada genotipo analizado). Este tratamiento resulta en la letalidad de los animales *Cdc20*(-/-Δ); RERT(+/-Cre) y correlaciona con la enorme pérdida de peso observada en (b). \*\*\*,  $p < 0.001$ . (c). Los animales deficientes para *Cdc20* muestran un elevado número de figuras mitóticas en todos los tejidos proliferativos analizados entre los que se encuentran el intestino y el testículo. Tinción de H&E. (d). Proliferación celular (Ki67) en el intestino de ratones *Cdc20*(-/-Δ); RERT(+/-Cre) y *Cdc20*(+/Δ); RERT(+/-Cre) tras la inducción de la recombinasa Cre. Determinación del ratio de células Ki67 positivas en el epitelio intestinal. Escalas, 50  $\mu$ M o 10  $\mu$ M (magnificaciones). Los datos en apartados b y d están representados como media y SD.



La eliminación genética de *Cdc20* en ratones adultos provocó idénticos defectos en la proliferación celular a los vistos previamente en animales jóvenes. Contrariamente a lo observado en animales recién destetados, un 25% de los ratones sobrevivió varios meses a la eliminación condicional del gen (Figura 14). Este resultado tiene importantes implicaciones terapéuticas ya que indica una menor susceptibilidad a la eliminación de *Cdc20* en etapas avanzadas de la vida.

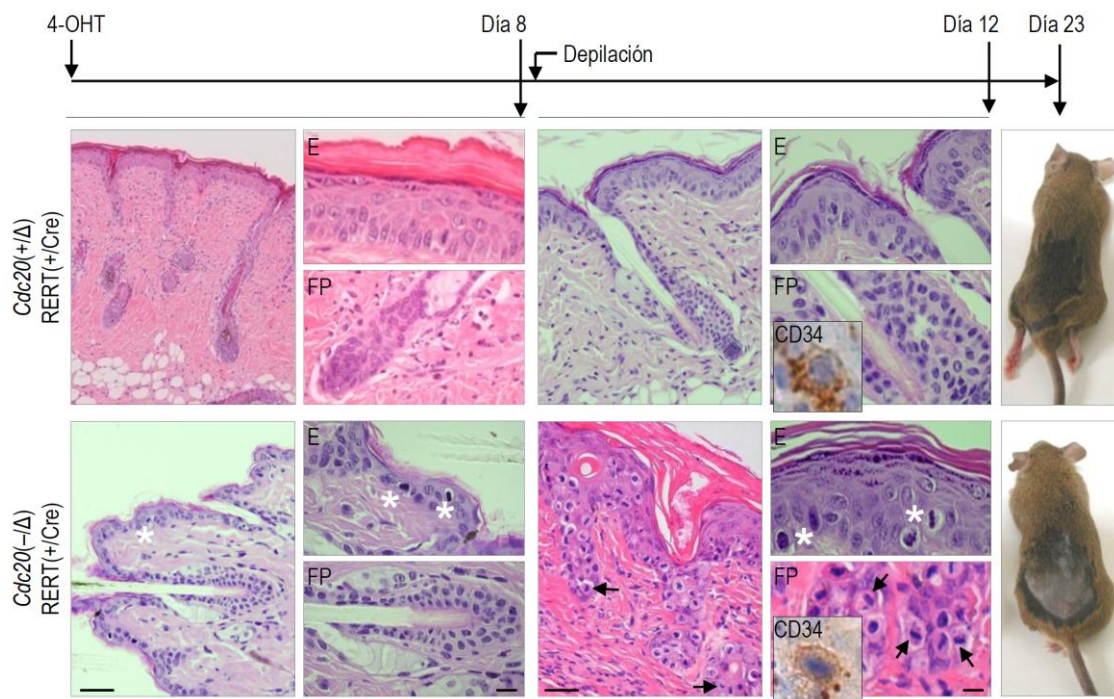


**Figura 14. *Cdc20* es necesario para la proliferación en ratones adultos.** Eliminación condicional de *Cdc20* en ratones de un año de edad. Estos animales fueron alimentados con una dieta complementada con 4-OHT durante dos meses. Los animales control, de genotipo *Cdc20*(+/-lox); RERT(+/-) (n=4); *Cdc20*(-/-lox); RERT(+/-) (n=4); *Cdc20*(+/-Δ); RERT(+/-Cre) (n=4), mostraron un comportamiento similar sin cambios significativos en su viabilidad tras el tratamiento con 4-OHT. Los animales deficientes para *Cdc20* [*Cdc20*(-/-Δ); RERT(+/-Cre); n=8; rojo] experimentaron una significativa pérdida de peso y una notable reducción en su viabilidad. Sin embargo, dos de los animales deficientes para *Cdc20* sobrevivieron al tratamiento de manera similar a los animales control. Los datos de esta figura están representados como media y SD.

#### 4. Caracterización de la ablación de *Cdc20* en células progenitoras

*Cdc20* resulta ser un gen esencial para todas aquellas células que se encuentran dentro del programa de proliferación. Sin embargo, un posible papel de *Cdc20* en células quiescentes o células progenitoras poco proliferativas es totalmente desconocido. Por ello, después de haber caracterizado el papel de este cofactor en células proliferativas, quisimos estudiar la posible función de *Cdc20* en células quiescentes mediante su eliminación condicional en células progenitoras de la piel. La aplicación de una única dosis de 4-OHT sobre la piel de animales de

genotipo *Cdc20*(-/-); RERT(+/-) resultó en un incremento significativo en el número de células en metafase en la capa basal de la epidermis. Estas figuras mitóticas corresponden a aquellos queratinocitos que se encuentran en la capa más externa de la piel llevando a cabo las últimas divisiones que les permiten alcanzar su máximo grado de diferenciación. En contraposición, ninguna figura mitótica fue observada en el folículo piloso donde se encuentra el principal nicho de células progenitoras de la piel (Figura 15). Ocho días después de la única aplicación de 4-OHT, los ratones fueron depilados para inducir la proliferación de las células precursoras y evaluar su capacidad regenerativa (Ruzankina et al. 2007).

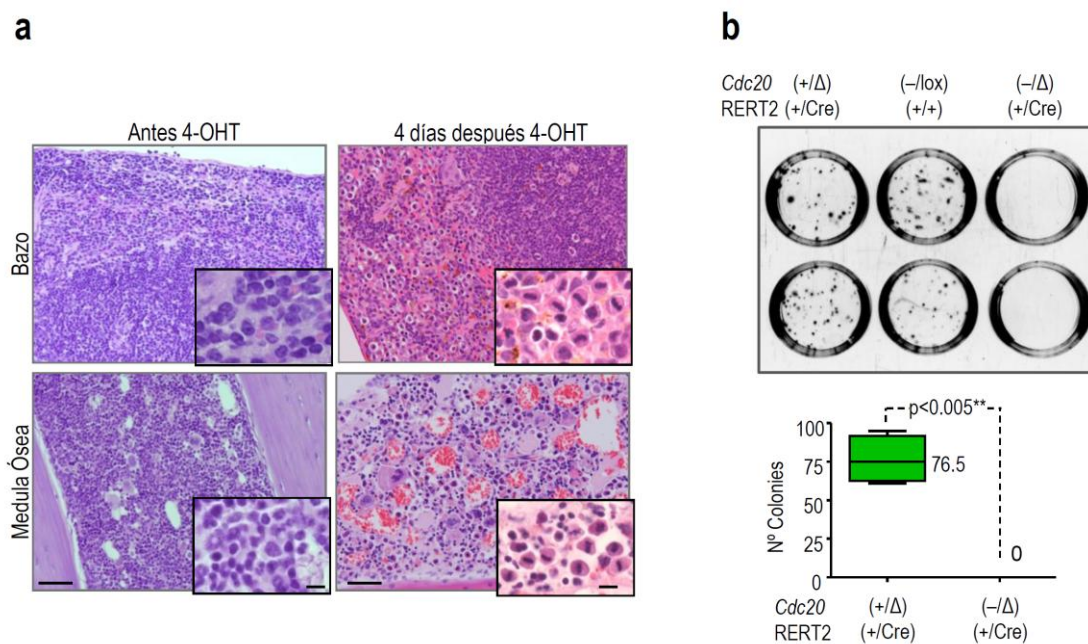


**Figura 15. *Cdc20* es esencial para la mitosis en células progenitoras de la piel.** La aplicación de una dosis tópica de 4-OHT resulta en un incremento en el número de células paradas en metafase en la capa basal de la epidermis de ratones deficientes para *Cdc20* [*Cdc20*(-/-); RERT(+/-)]. Estas figuras mitóticas no son observadas ni en el folículo piloso (FP) ni en los animales control [*Cdc20*(+/Δ); RERT(+/-)]. Tras la depilación de estos animales, sin necesidad de ninguna dosis adicional de 4-OHT, se observa un número destacable de células en metafase en el folículo piloso de los animales knock-out para *Cdc20*. Muchas de las células en metafase son positivas para la tinción de CD34. Estas metafases no representan la proliferación normal existente en el folículo ya que la regeneración capilar se muestra impedida en los animales deficientes para *Cdc20*. H&E, hematoxilina y eosina. Inmunodetección de CD34. Escala, 50 μM o 10 μM (CD34).

Tras la depilación, pudimos observar un claro incremento en el número de células en metafase en el folículo piloso. Muchas de las células paradas en mitosis fueron positivas para la

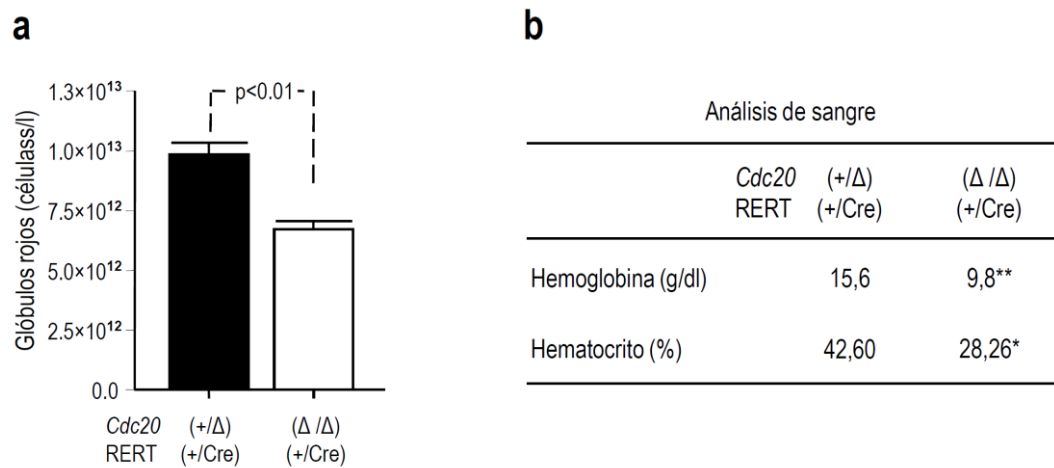
tinción con CD34, un marcador de células progenitoras de la piel. La parada en metafase de las células progenitoras del folículo piloso supuso un impedimento en la regeneración capilar de los animales *Cdc20*<sup>(-/-Δ)</sup>; RERT<sup>(+/Cre)</sup>. Todos estos efectos fueron observados sin la necesidad de ninguna aplicación adicional de 4-OHT (Figura 15). Estos resultados sugieren que, mientras la eliminación de *Cdc20* en células quiescentes no presenta ninguna consecuencia, la entrada de estas células en el ciclo celular y su compromiso hacia la división las conduce hacia una detención permanente en metafase.

Con el objetivo de comprobar el requerimiento de *Cdc20* para la proliferación de otras células progenitoras, analizamos la eliminación condicional del cofactor en tejidos hematopoyéticos. La ablación genética de *Cdc20* resultó en una masiva presencia de células precursoras en mitosis en tejidos como el bazo o la medula ósea (Figura 16a). La parada en metafase de los progenitores hematopoyéticos tras el tratamiento con 4-OHT impidió la formación de colonias en un ensayo *ex vivo* utilizando precursores de medula ósea (Figura 16b).



**Figura 16. *Cdc20* es esencial para la mitosis en progenitores hematopoyéticos.** (a). Imágenes representativas de bazo y medula ósea de ratones *Cdc20*<sup>(-/-Δ)</sup>; RERT<sup>(+/Cre)</sup> antes y después del tratamiento con 4-OHT. Tras la inducción de la recombinasa Cre observamos un importante número de figuras mitóticas en metafase en ambos órganos. H&E. Escala, 50  $\mu$ M o 10  $\mu$ M (magnificaciones). (b). Ensayo de formación de colonias de precursores hematopoyéticos. El mismo número de precursores hematopoyéticos procedentes de medula ósea y con el genotipo indicado fueron sembrados en placas de Methocult. Representación del número de colonias obtenidas (media y SD) tras haber sido crecidas en presencia de 4-OHT.

Como consecuencia de la falta de proliferación de los precursores hematopoyéticos, los animales deficientes para Cdc20 desarrollaron una anemia caracterizada por los bajos valores de hemoglobina y hematocrito, y una disminución significativa del número de glóbulos rojos (Figura 17a y 17b). Todos estos resultados apuntan a un requerimiento de Cdc20 para la normal división de los precursores hematopoyéticos.



**Figura 17. Cdc20 es esencial para la proliferación de progenitores hematopoyéticos.** (a). Representación del número de glóbulos rojos en ratones *Cdc20*(-/-); RERT(+/-) y *Cdc20*(+/-); RERT(+/-) tras haber sido tratados con 4-OHT durante 25 días (media y SD). (b). Valores de hemoglobina y hematocrito en ratones con el genotipo indicado después de 25 días de tratamiento con 4-OHT. 10 ratones de cada genotipo fueron analizados (n=10).

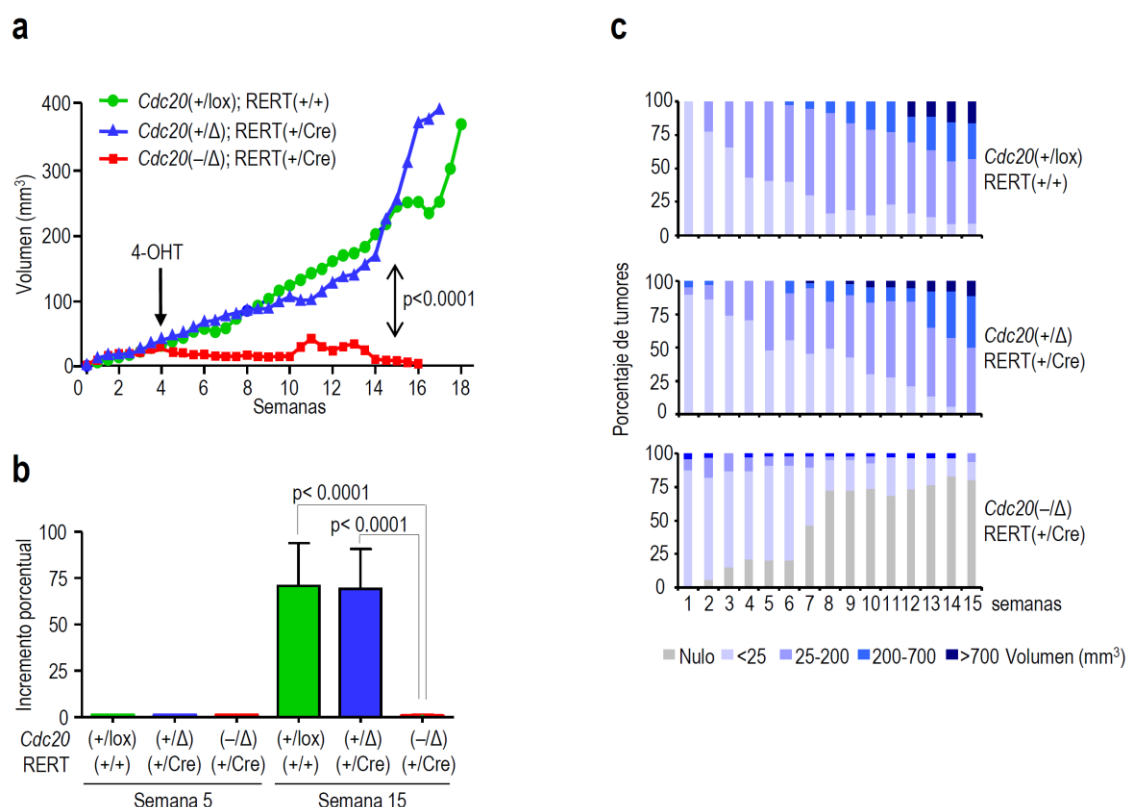
## 5. Caracterización de la eliminación condicional de Cdc20 en tumores

Como ya hemos mencionado en la introducción, el cáncer puede ser entendido como una enfermedad del ciclo celular. El cáncer es un desorden proliferativo caracterizado por el crecimiento descontrolado de las células tumorales. Dado el efecto letal de la eliminación de Cdc20 en células que proliferan, nos propusimos evaluar las consecuencias de la ablación condicional de Cdc20 en tumores.

### 5.1. Efecto de la ablación condicional de Cdc20 en tumores benignos

El estudio de la eliminación condicional de Cdc20 fue llevado a cabo en papilomas benignos inducidos por el tratamiento carcinogénico con sustancias químicas como el 7, 12-dimetilbenzantraceno (DMBA) y el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Este protocolo

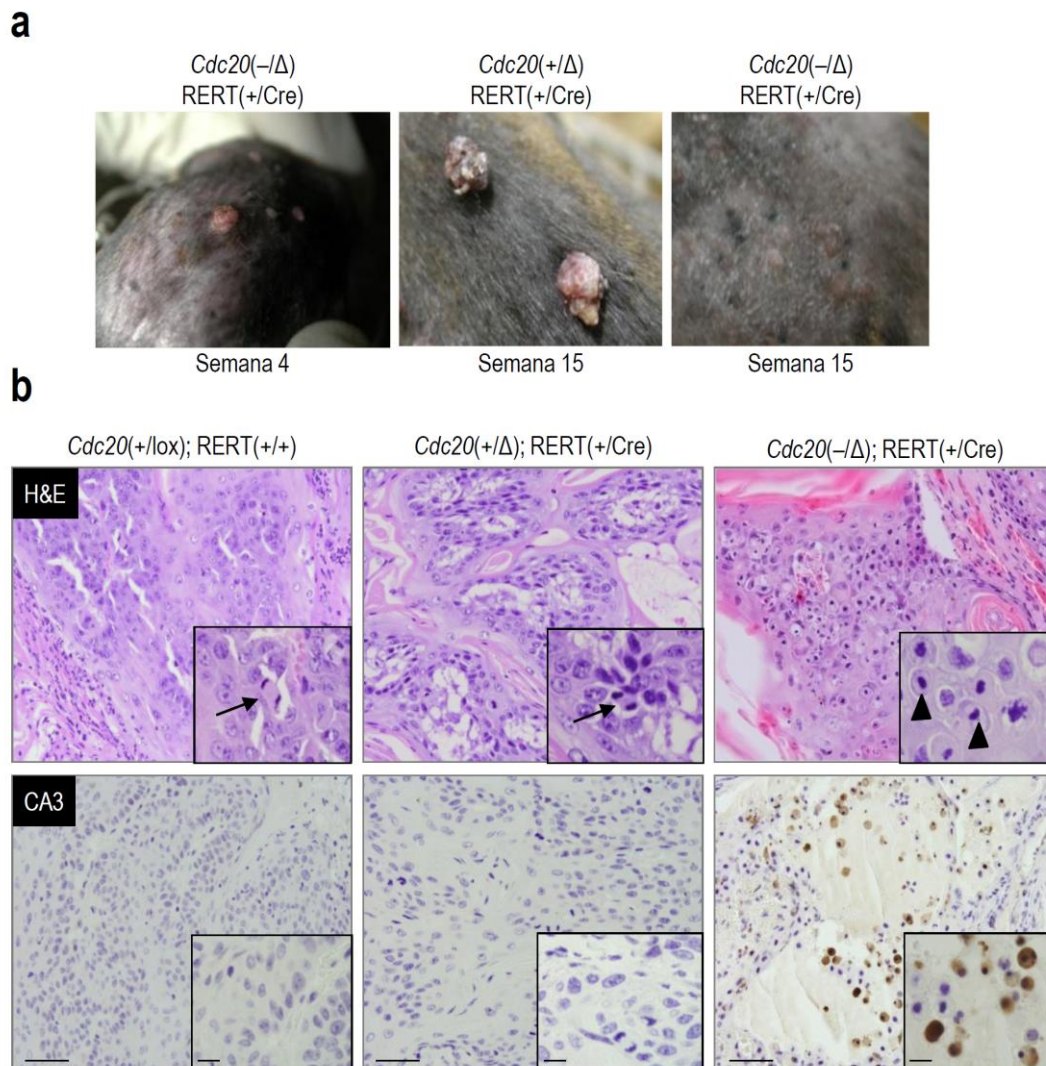
carcinogénico permitió la aparición de un número equivalente de tumores benignos en animales con genotipo *Cdc20*(-/*lox*); RERT(+/*Cre*) y los respectivos controles portando el alelo *Cdc20*(+) o siendo deficientes para el alelo RERT(*Cre*). El 4-OHT fue aplicado tópicamente sobre el papiloma cuando estos tumores alcanzaron un tamaño de 50mm<sup>3</sup> (aproximadamente 4 semanas después de la aparición del papiloma) (Figura 18a). A pesar de la aplicación de 4-OHT, los tumores de genotipo *Cdc20*(+/*lox*); RERT(+/*+*) y *Cdc20*(+/ $\Delta$ ); RERT(+/*Cre*) mostraron un crecimiento exponencial. Sin embargo, la eliminación genética de *Cdc20* causó una total parada en el crecimiento de los papilomas (Figura 18b y 18c).



**Figura 18. La eliminación condicional de *Cdc20* resulta en la regresión de los tumores benignos de piel.** (a). Los papilomas benignos fueron inducidos siguiendo un protocolo carcinogénico en el que las sustancias químicas utilizadas fueron el DMBA y el TPA. Los papilomas fueron medidos dos veces por semana durante 17 semanas. Los tumores inducidos en los animales, con el genotipo indicado, fueron tratados tópicamente con 4-OHT cuando estos alcanzaron un tamaño de 50 mm<sup>3</sup> (4 semanas aproximadamente). (b). Representación del incremento porcentual del volumen de los tumores en la semana 5 (1 semana después del inicio del tratamiento con 4-OHT) y la semana 15 del protocolo carcinogénico. (c). Representación del porcentaje de tumores con el volumen indicado para cada uno de los genotipos ensayados. El incremento en el porcentaje de tumores que desaparecen solo se observa en los animales de genotipo *Cdc20*(-/ $\Delta$ ); RERT(+/*Cre*). (n=10 animales por cada genotipo ensayado).



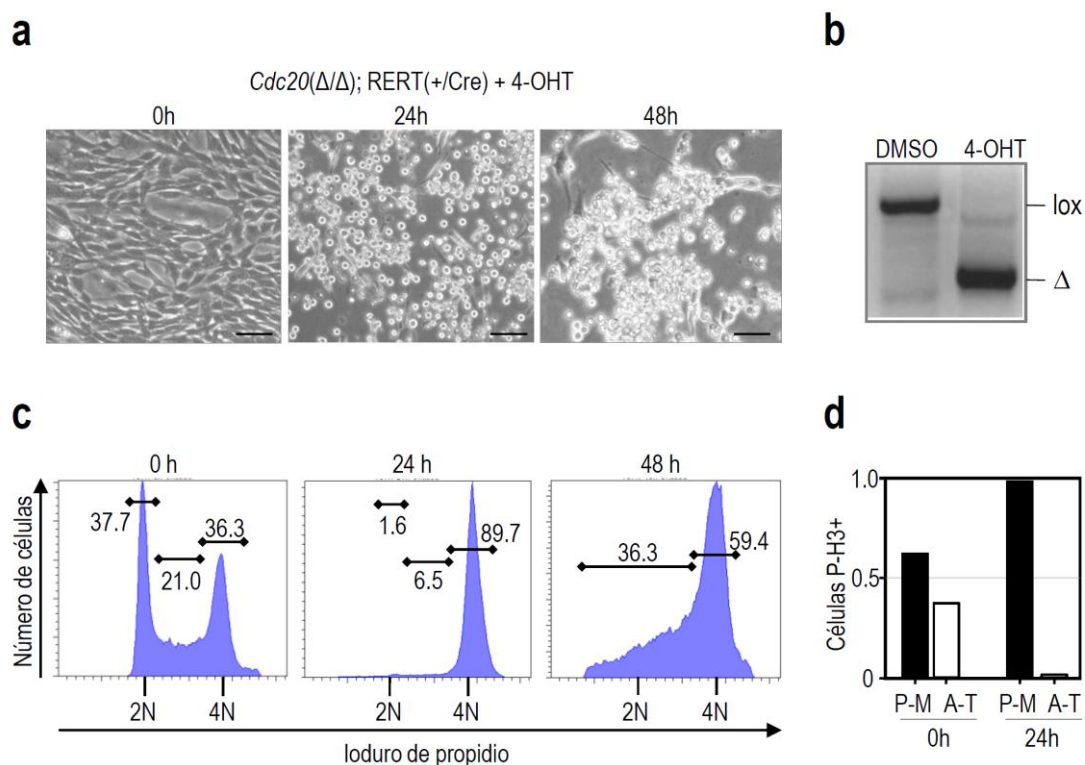
Los tumores en los que *Cdc20* fue eliminado adquirieron una apariencia blanquecina para posteriormente caerse y no volver a aparecer sobre la piel de estos ratones (Figura 19a). El análisis histológico de los papilomas reveló una importante parada de las células tumorales en metafase. La desaparición de los tumores benignos tras el tratamiento con 4-OHT quedó justificada por la masiva muerte celular observada en los tumores en los que *Cdc20* fue eliminado (Figura 19b).



**Figura 19. *Cdc20* es requerido para la división celular en tumores benignos.** (a). Imágenes representativas de los papilomas antes (semana 0) y después del tratamiento (semana 15) con 4-OHT. (b). Análisis histológico de los papilomas inducidos en los animales con los genotipos indicados. Mientras que en los tumores de los animales control se observan pocas figuras mitóticas (flechas; anafase), los tumores deficientes para *Cdc20* muestran una importante acumulación de células en metafase (cabeza de flecha) y células apoptóticas [células positivas para caspasa-3-activa (CA3)]. H&E. Escala, 50  $\mu$ m o 10  $\mu$ m (magnificaciones).

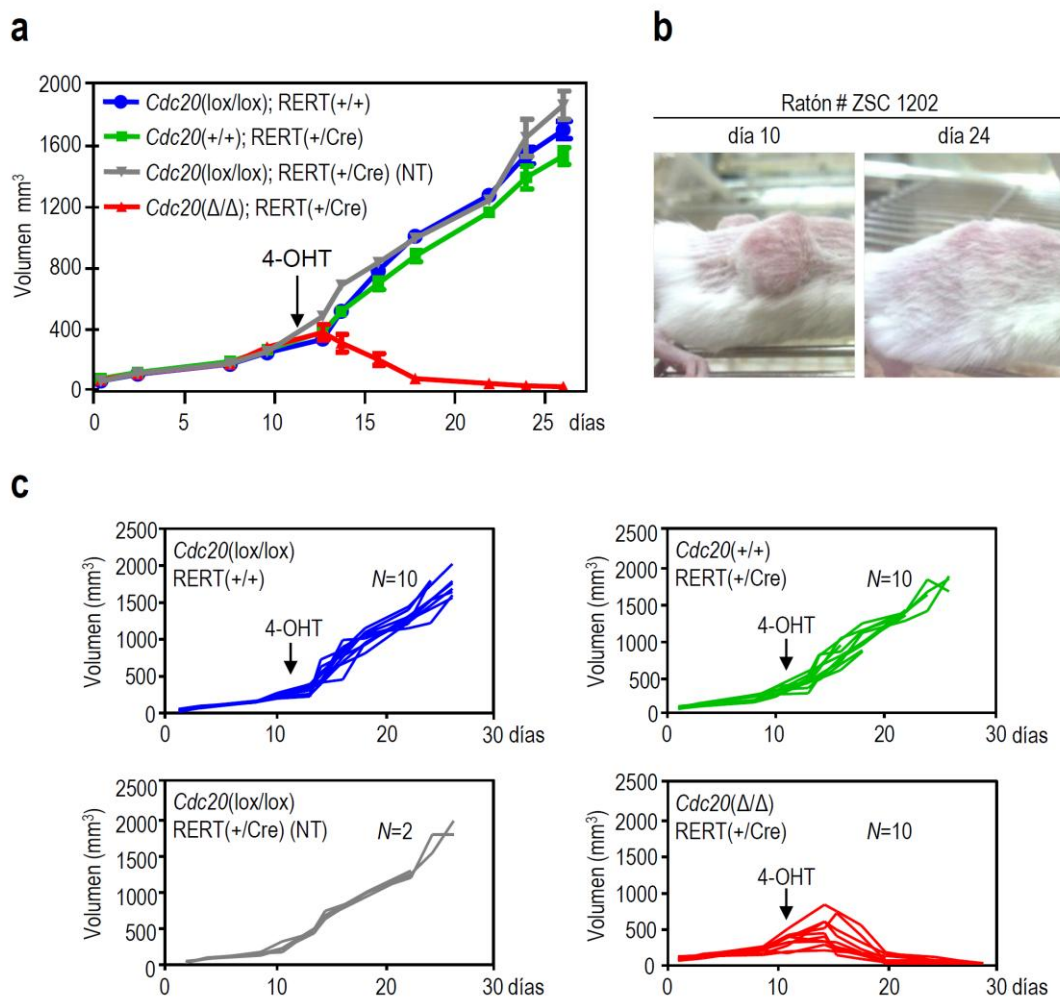
## 5.2. Efecto de la ablación condicional de Cdc20 en tumores agresivos

Ya que los papilomas inducidos por los carcinógenos DMBA y TPA sobre la piel son relativamente benignos, quisimos analizar la eliminación de Cdc20 en fibrosarcomas agresivos inducidos por fibroblastos transformados de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre). Estos fibroblastos fueron transformados por la expresión de H-Ras V12 y E1A, dos oncogenes que alteran las vías más importantes de la supresión tumoral (Frisch and Mymryk 2002). Los focos formados por las células transformadas fueron aislados para la generación de clones celulares estables. Utilizando estos fibroblastos transformados realizamos diversos ensayos *in vitro* para analizar el efecto de la eliminación genética de Cdc20.



**Figura 20. Cdc20 es esencial para la proliferación de células transformadas con los oncogenes H-Ras V12 y E1A.** (a). Fibroblastos embrionarios de ratón con genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre) fueron transformados con los oncogenes H-Ras V12 y E1A. Cdc20 fue eliminado genéticamente por la adición de 4-OHT a una concentración 1  $\mu$ M. (b). PCR representativa de la escisión del exón 2 48 horas después de la inducción de la recombinasa Cre. (c). El análisis del ciclo celular mediante tinción con ioduro de propidio reveló una importante acumulación de células 4N 24 horas después de la adición de 4-OHT. Muchas de las células sub-4N que se observan a las 48h corresponden a las células que experimentan apoptosis tras la detención permanente en mitosis. (d). Representación gráfica de la distribución de células mitóticas en prometafase (P) - metafase (M) o anafase (A) – telofase (T) 0 y 24 horas después del tratamiento con 4-OHT. Escala, 50  $\mu$ M.

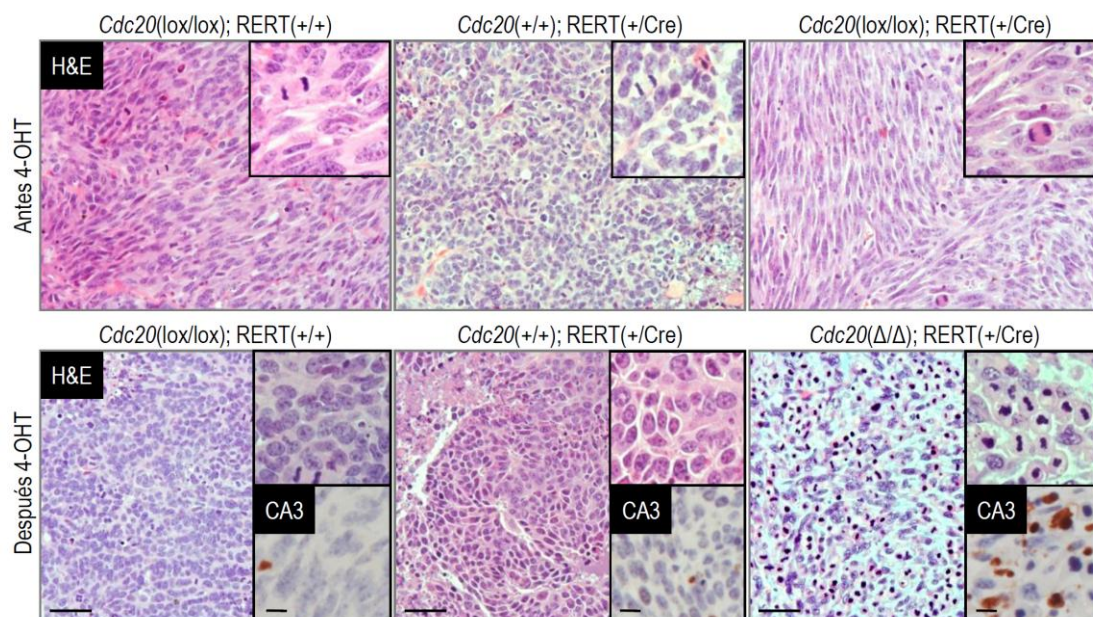
La inducción de la recombinasa Cre en las células transformadas, mediante la aplicación de 4-OHT, resultó en una parada drástica en mitosis (Figura 20a). 24 horas después del inicio del tratamiento, la mayor parte de las células se encontraban paradas en metafase (Figura 20d). Muchas de estas células experimentaron muerte celular por apoptosis pocas horas después (Figura 20c). El tratamiento de los fibroblastos transformados de genotipo *Cdc20*(+/+); RERT(+/-) y *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-) con la misma dosis de 4-OHT no resultó en ninguno de los efectos observados en las células en las que *Cdc20* había sido eliminado (Figura 20b).



**Figura 21. La ablación genética de *Cdc20* resulta en la regresión tumoral de fibrosarcomas agresivos.** (a). MEFs transformados con los oncogenes H-Ras V12 y E1A fueron inyectados subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos. El volumen de los tumores fue determinado 3 veces por semana. Una vez los tumores alcanzaron un volumen medio de 350 mm<sup>3</sup> los animales recibieron 3 dosis (i.p) semanales de 4-OHT. El análisis incluyó 10 tumores de cada genotipo tratados con 4-OHT y 2 tumores *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-) no tratados. (media y SD). (b). Imagen representativa de un fibrosarcoma de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-) al inicio (día 10) y al final del tratamiento (día 24) con 4-OHT (c). Representación del crecimiento individual de cada uno de los tumores incluidos en el análisis. Los tumores son representados atendiendo a su genotipo y al tratamiento recibido.



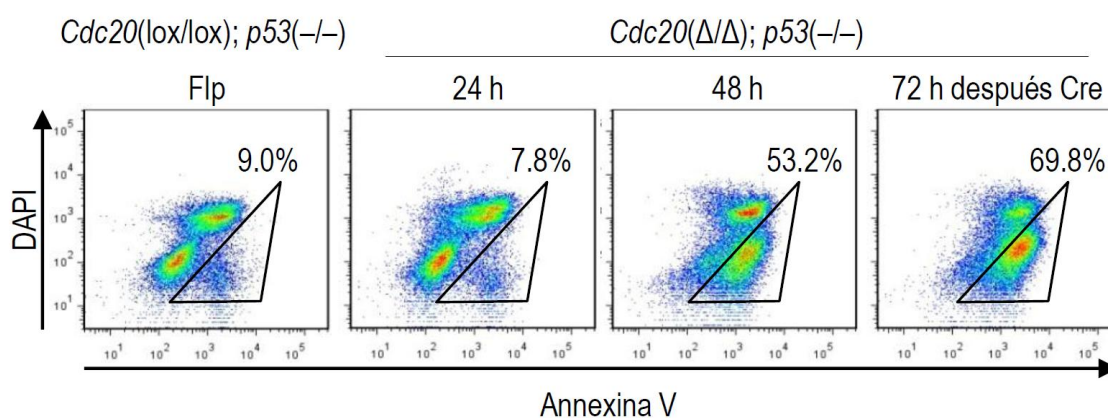
Una vez caracterizado el fenotipo resultante de la eliminación condicional de *Cdc20* en las células transformadas, procedimos a estudiar la ablación del cofactor en tumores agresivos. Para ello, los fibroblastos transformados de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-) y sus respectivos controles [*Cdc20*(lox/lox); RERT(+/+) y *Cdc20*(+/-); RERT(+/-)] fueron inyectados en ratones inmunodeprimidos (SCID). En tan solo dos semanas, las células tumorales formaron fibrosarcomas muy agresivos. Una vez los tumores alcanzaron un volumen medio de 350 mm<sup>3</sup>, los animales fueron tratados intraperitonealmente (i.p) con 4-OHT tres veces por semana (Figura 21a). A pesar de que los fibrosarcomas de genotipo *Cdc20*(Δ/Δ); RERT(+/-) presentaron un ligero crecimiento en los dos primeros días de tratamiento, estos tumores sufrieron una completa parada de su crecimiento. La eliminación de *Cdc20* condujo a la desaparición total de todos los tumores tan solo quince días después del inicio del tratamiento (Figura 21b). En contraposición, los fibrosarcomas de los animales control presentaron un crecimiento exponencial hasta que por motivos éticos los animales fueron sacrificados (Figura 21c).



**Figura 22. La ablación genética de *Cdc20* en fibrosarcomas provoca la parada permanente en metafase y la muerte por apoptosis de las células tumorales.** Imágenes representativas de los tumores 4 días después de la primera dosis de 4-OHT. Las imágenes magnificadas muestran figuras mitóticas (anafases) rodeadas de células en interfase en los tumores control o antes de haberse iniciado el tratamiento. Los fibrosarcomas *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-) tratados con 4-OHT contienen un elevado número de células en metafase, muchas de las cuales ya han iniciado el programa de muerte celular. H&E, hematoxilina y eosina. CA3, inmunodetección de caspasa-3-activa. Escala, 50 μm o 10 μm (magnificaciones).

El posterior análisis histológico de los fibrosarcomas de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre) no tratados y los tumores control [*Cdc20*(lox/lox); RERT(+/+) y *Cdc20*(+/-); RERT(+/-Cre)] tratados con 4-OHT reveló un importante número de células mitóticas, (mayoritariamente anafases) como corresponde a los tumores con una alta capacidad proliferativa. En cambio, los fibrosarcomas *Cdc20*(Δ/Δ); RERT(+/-Cre) tratados con 4-OHT mostraron una masiva presencia de células en metafase, que tras una prolongada parada en mitosis experimentaron una importante muerte celular por apoptosis que en ningún caso fue observada en los tumores control (Figura 22).

Uno de los resultados más destacable tras la eliminación de *Cdc20* fue la eficaz inducción de apoptosis que se produjo tanto en los tumores benignos como en los fibrosarcomas agresivos. Con el objetivo de profundizar en el mecanismo molecular, analizamos si esta muerte celular en mitosis era dependiente del gen *p53*. Para ello, evaluamos la muerte celular provocada por la falta de *Cdc20* en células deficientes para *p53*. Sorprendentemente, la apoptosis inducida por la ablación de *Cdc20* no fue prevenida por la ausencia del gen *p53* (Figura 23).



**Figura 23. La apoptosis inducida por la eliminación de *Cdc20* es independiente de *p53*.** Ratones *Cdc20*(lox/lox) fueron cruzados con animales deficientes para *p53* para generar fibroblastos embrionarios de ratón *Cdc20*(lox/lox); *p53*(-/-). Estos fibroblastos fueron infectados con adenovirus que expresan la recombinasa Cre, para inducir la eliminación de *Cdc20*, o la recombinasa Flp como control del experimento. Los niveles de apoptosis fueron determinados 24, 48 y 72 horas después de la infección mediante la inmunodetección de annexina V por citometría de flujo.

Estos resultados sugieren que una posible terapia basada en la inhibición de la actividad de *Cdc20* podría ser de gran utilidad en un amplio número de tumores, con independencia del

status de genes como Ras, pRb o p53 que representan tres de los genes más mutados en cáncer.

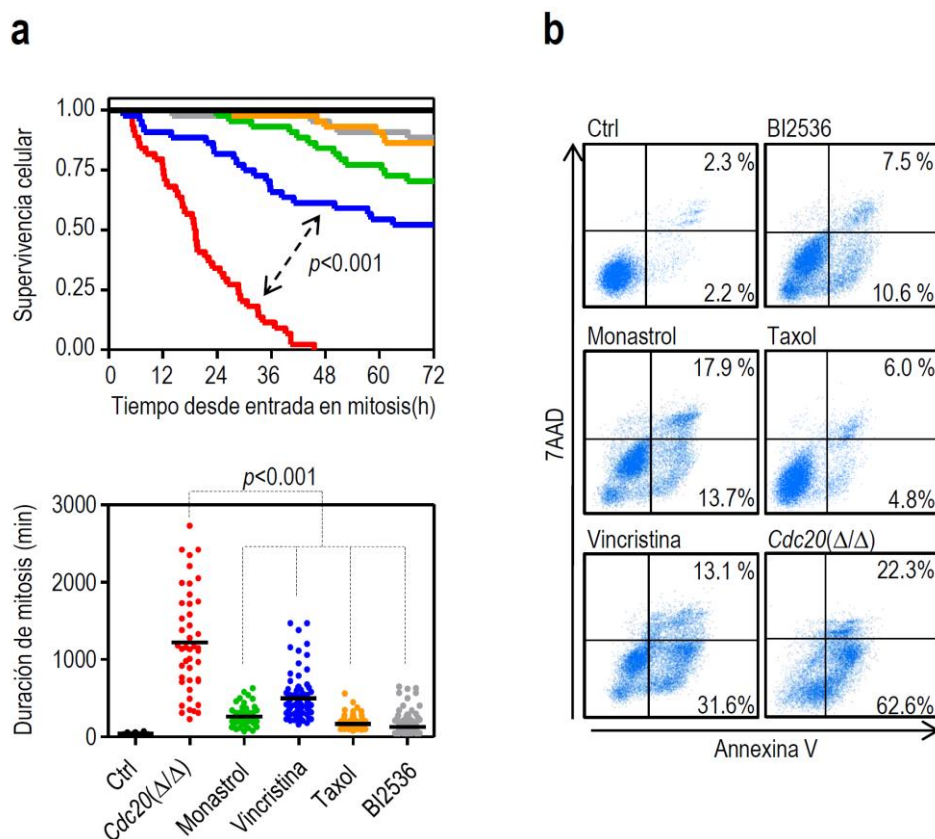
## **6. Validación de Cdc20 como diana en la terapia contra el cáncer**

Algunos de los fármacos más efectivos en la terapia contra el cáncer han sido las denominadas drogas antimitóticas. La mayor parte de estos fármacos actúan alterando la dinámica de polimerización de los microtúbulos y por tanto impidiendo la división celular. Sin embargo, los importantes efectos adversos de estos fármacos y su limitada eficacia frente a determinados tumores han generado la necesidad de desarrollar nuevas moléculas menos tóxicas y con mayor potencia farmacológica. Un gran número de estos nuevos inhibidores se encuentran actualmente en las últimas fases de los ensayos clínicos. Dado que la ablación genética de Cdc20 ha mostrado una alta eficacia en la inducción de muerte celular y en la regresión tumoral, creímos pertinente comparar las actuales drogas mitóticas y los nuevos inhibidores con la eliminación condicional de Cdc20.

### **6.1. La eliminación genética de Cdc20 es más eficaz induciendo muerte celular que las principales drogas antimitóticas**

En este ensayo comparamos los efectos de la ablación condicional de Cdc20 y las actuales drogas antimitóticas. Para este fin, utilizamos inhibidores clásicos que afectan a la dinámica de microtúbulos, tales como taxol y vincristina, y dos inhibidores que se encuentran actualmente en ensayos clínicos: BI2536, un inhibidor de la quinasa Plk1; y monastrol, un inhibidor de la quinesina Eg5. Los fibroblastos tumorales que expresan los oncogenes H-Ras V12 y E1A, junto con la histona H2B fusionada a la proteína fluorescente GFP (de green fluorescent protein) fueron tratados con 4-OHT o con las drogas anteriormente indicadas. La progresión a través del ciclo celular y la supervivencia de estas células fueron analizadas mediante su seguimiento por videomicroscopía durante 72 horas. El tratamiento de las células tumorales con los diferentes inhibidores provocó una significativa parada en mitosis que se acompañó de una letalidad sorprendentemente baja (Figura 24a). Con todos los inhibidores ensayados más del 50% de las células fueron viables durante las 72 horas del tratamiento

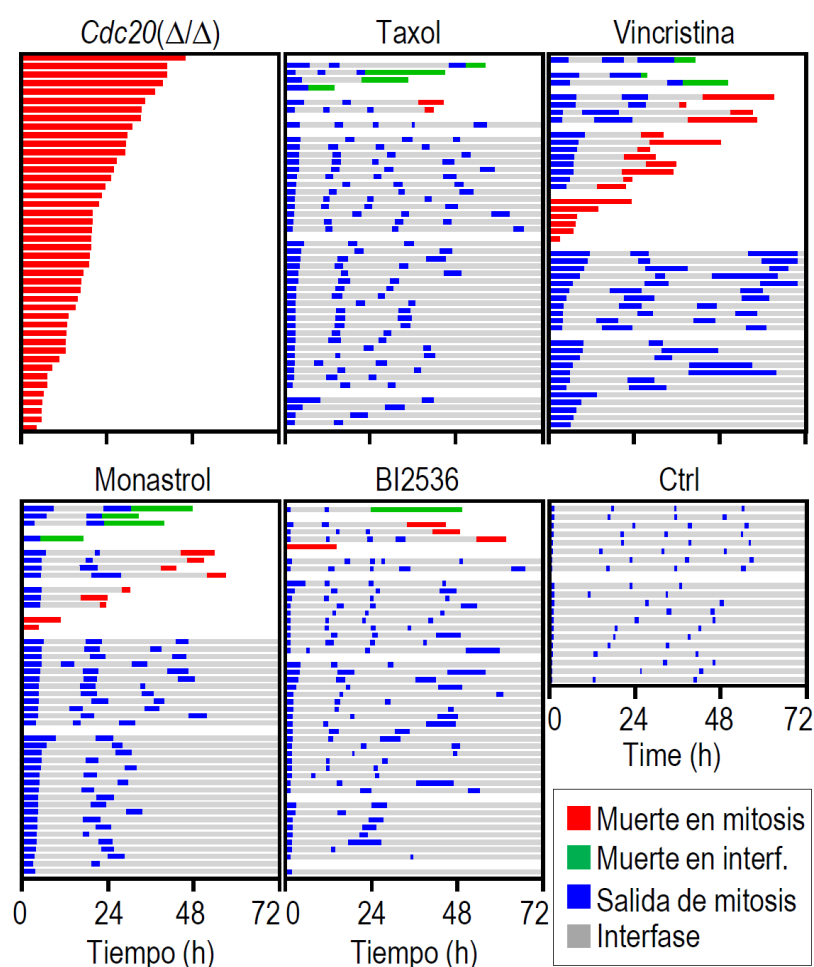
(Figura 24b). En contraposición, todas las células deficientes para Cdc20 experimentaron muerte por apoptosis con una latencia media de  $20 \pm 11$  horas (Figura 24a).



**Figura 24. La ablación de Cdc20 induce la muerte celular por apoptosis de una manera más eficaz que los actuales inhibidores mitóticos.** (a). Fibroblastos transformados con los oncogenes H-Ras V12 y E1A de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre) que expresan la histona H2B-GFP fueron tratados con 4-OHT (1 $\mu$ M) y con las drogas antimitóticas indicadas (Vincristina, 1 $\mu$ M; monastrol, 100 $\mu$ M; taxol, 200nM y BI2536, 100nM). 24 horas después del inicio del tratamiento las células fueron filmadas durante 72 horas. Representación gráfica del ratio de células vivas y la duración de mitosis de las células *Cdc20* knock-out (rojo) y las células tratadas con vincristina (azul), monastrol (verde), taxol (naranja) y el inhibidor de Plk1 (gris). Todas las células deficientes para *Cdc20* mueren en las primeras 48 horas mientras, que más del 50% de las células tratadas con las drogas antimitóticas son viables durante las 72 horas del tratamiento. (b). Análisis de muerte celular por citometría de flujo mediante la inmunodetección del marcador de apoptosis annexina V y el marcador de necrosis 7AAD. Las células fueron analizadas 72 horas después del inicio del tratamiento.

El análisis individual de las células reveló que, mientras la eliminación de *Cdc20* provocaba una parada persistente en mitosis que en todos los casos finalizaba con la muerte de la célula por apoptosis, las drogas antimitóticas inducían una parada en mitosis transitoria de la que una gran parte de las células conseguían escapar. De esta manera, solo unas pocas células

morían en mitosis o en interfase mientras el resto permanecían viables experimentando varios ciclos de división celular (Figura 25).

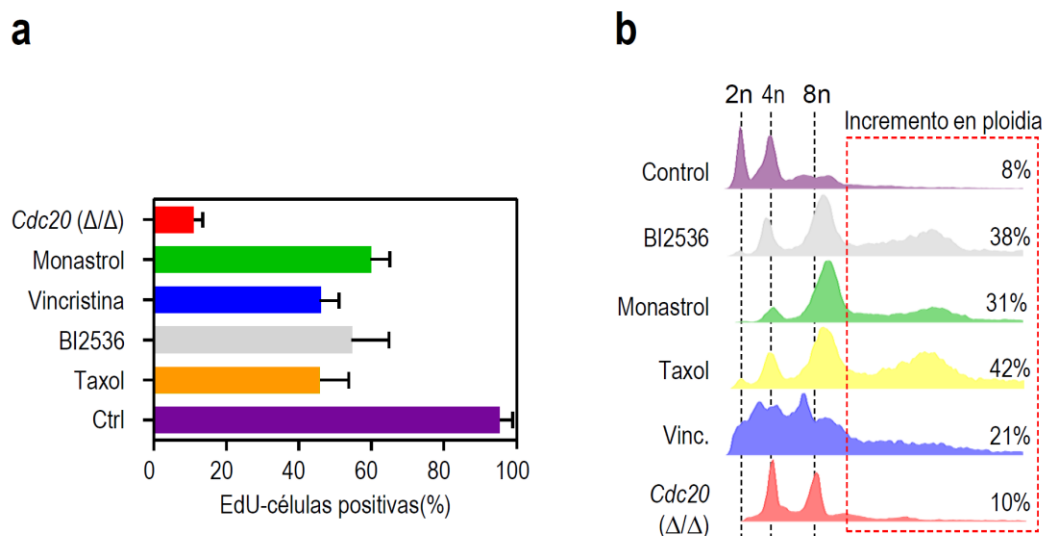


**Figura 25. La persistente parada en mitosis inducida tras la eliminación de Cdc20 es la responsable de la eficaz muerte celular por apoptosis.** Fibroblastos transformados con los oncogenes H-Ras V12 y E1A de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre) que expresan la histona H2B-GFP fueron tratados con 4-OHT (1μM) y con los inhibidores mitóticos indicados (Vincristina, 1μM; monastrol, 100μM; taxol, 200nM y BI2536, 100nM). 24 horas después del inicio del tratamiento las células fueron filmadas durante 72 horas. La progresión y el destino de las células en mitosis o en interfase son esquematizadas por líneas de colores. Líneas rojas o verdes representan mitosis o interfases que finalizan en muerte por apoptosis. Líneas azules y grises indican la normal alternancia entre mitosis e interfase. Cada línea representa el comportamiento de una sola célula (n=44 células por tratamiento).

Las ciclos celulares en presencia de los inhibidores mitóticos se caracterizaron por una eficiente duplicación del material genético y por la salida de mitosis sin la segregación de los cromosomas duplicados (Figura 26a). Estos ciclos celulares con mitosis no funcionales

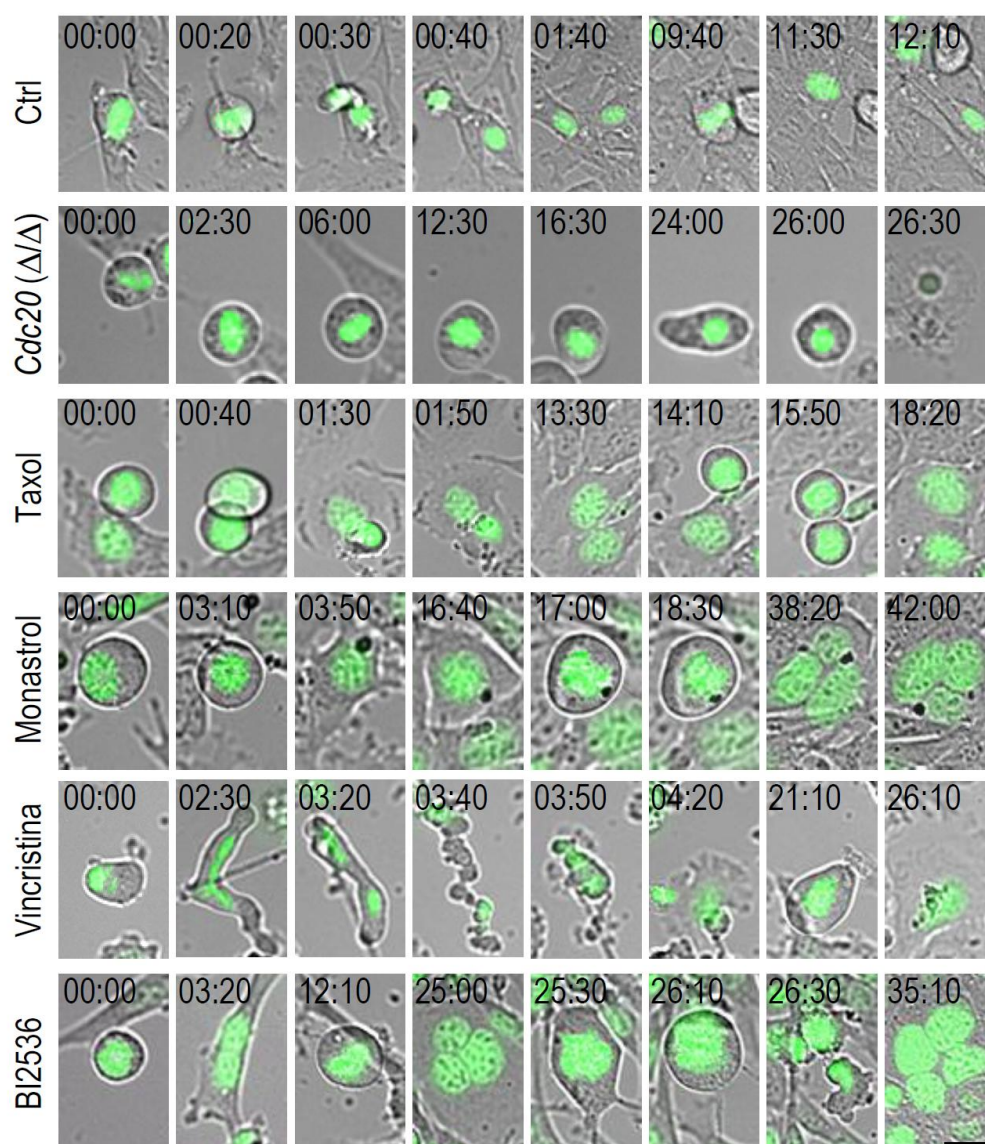


condujeron al incremento de la ploidía de las células tumorales sin verse afectada su viabilidad celular (Figura 26b).



**Figura 26. Efectos causados por la eliminación de Cdc20 o el tratamiento con inhibidores antimitóticos en la proliferación y la supervivencia celular.** (a). Duplicación del DNA en células *Cdc20*(lox/lox); RERT(+)/Cre; H-Ras-E1A tratadas con 4-OHT (1 $\mu$ M) o con los inhibidores mitóticos indicados (Vincristina, 1 $\mu$ M; monastrol, 100 $\mu$ M; taxol, 200nM y BI2536, 100nM). 24 horas después de este tratamiento, el análogo EdU fue añadido al medio y la síntesis del DNA fue medida 48 horas después mediante la inmunodetección de EdU por citometría de flujo. (b). Análisis de la ploidía en células tratadas con los inhibidores indicados y en células deficientes para Cdc20 mediante el análisis del contenido de DNA por citometría de flujo.

Así, las principales drogas antimitóticas que actúan a nivel de los microtúbulos y que son de amplio uso en clínica, han mostrado una eficacia reducida en su capacidad para inducir apoptosis en células transformadas. El mismo resultado ha sido observado con los nuevos inhibidores antimitóticos que están actualmente en fases avanzadas de ensayos clínicos. El principal motivo que disminuye la eficacia de estos fármacos es la capacidad de las células tumorales para evadir la parada en mitosis y de esta manera evitar la muerte celular. Contrariamente, la persistente e irreversible parada en metafase inducida por la eliminación de Cdc20 conduce a la ineludible muerte celular en mitosis, tal y como se aprecia en la Figura 27.

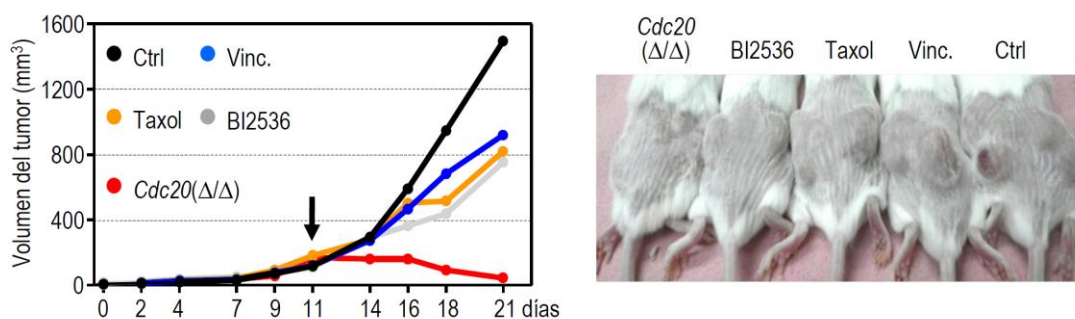


**Figura 27. Evolución de la mitosis en presencia de drogas antimitóticas o en ausencia de Cdc20.** Imágenes representativas del análisis por videomicroscopía de células *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre); H-Ras-E1A; H2B-GFP tratadas con 4-OHT (1μM, para la generación de las células deficientes para Cdc20) o con los inhibidores mitóticos indicados (Vincristina, 1μM; monastrol, 100μM; taxol, 200nM y BI2536, 100nM). El tiempo es mostrado como h:min y t=0 corresponde al momento de entrada en mitosis. Escala, 50μM.

## 6.2. Regresión tumoral eficaz tras la eliminación de Cdc20

Dado la relevancia de las drogas antimitóticas en la terapia antineoplásica actual, quisimos comparar el efecto terapéutico *in vivo* de la eliminación de Cdc20 frente a los tratamientos estándar con taxol o vincristina y las nuevas terapias mitóticas representadas por el

inhibidor de Plk1, BI2536. Con este objetivo, los fibroblastos de genotipo *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre), transformados con los oncogenes H-Ras V12 y E1A, fueron inyectados en ratones inmunodeprimidos (SCID). El tratamiento con 4-OHT y los inhibidores mitóticos comenzó cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 200 mm<sup>3</sup>. Las drogas fueron administradas intraperitonealmente tres veces por semana. Los tumores no fueron sometidos a ningún tratamiento presentaron un crecimiento exponencial hasta que por motivos éticos los animales fueron sacrificados. Por el contrario, mientras el tratamiento con taxol, vincristina y BI2536 resultó en un modesto efecto en la progresión del tumor, la eliminación condicional de *Cdc20* resultó en la completa regresión del tumor en tan solo diez días (Figura 28).

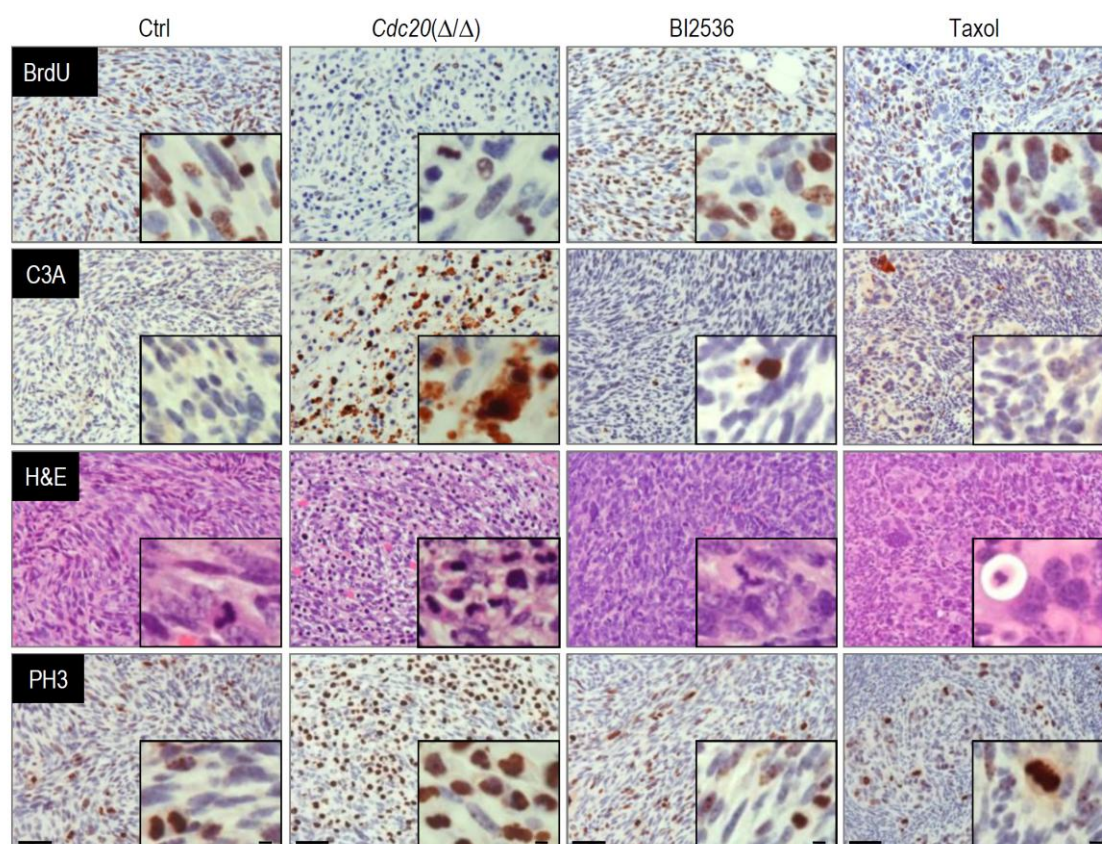


**Figura 28. Comparación del efecto terapéutico *in vivo* de la eliminación de *Cdc20* y las principales drogas antimitóticas.** Fibroblastos transformados *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre); H-Ras-E1A fueron inyectados subcutáneamente en ratones SCID y el volumen de los tumores resultantes fue determinado 3 veces por semana. Los animales fueron tratados intraperitonealmente con 4-OHT y con los inhibidores mitóticos (taxol, vincristina y BI2536) cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 200 mm<sup>3</sup>. Un total de 16 tumores (n=16) por cada droga ensayada fueron analizados en este ensayo.

De acuerdo con los resultados observados en los ensayos *in vitro*, el análisis histológico e inmunohistoquímico de los fibrosarcomas en los que *Cdc20* fue eliminado evidenció una pérdida total de la capacidad proliferativa de las células tumorales. La eliminación genética de *Cdc20* en las células malignas provocó una parada permanente en mitosis como sugieren los altos niveles de fosfo-histona H3. Todos los tumores tratados con 4-OHT experimentaron una muerte celular masiva, en consonancia con la desaparición del tumor pocos días después del inicio del tratamiento. Por el contrario, los fibrosarcomas tratados con los distintos inhibidores mitóticos presentaron únicamente una ligera ralentización de su crecimiento. A pesar de que la afectación del huso mitótico dio lugar a tumores con células altamente poliploides, ninguna de las



drogas antimitóticas se mostró eficaz a la hora de inducir muerte celular por apoptosis (Figura 29).

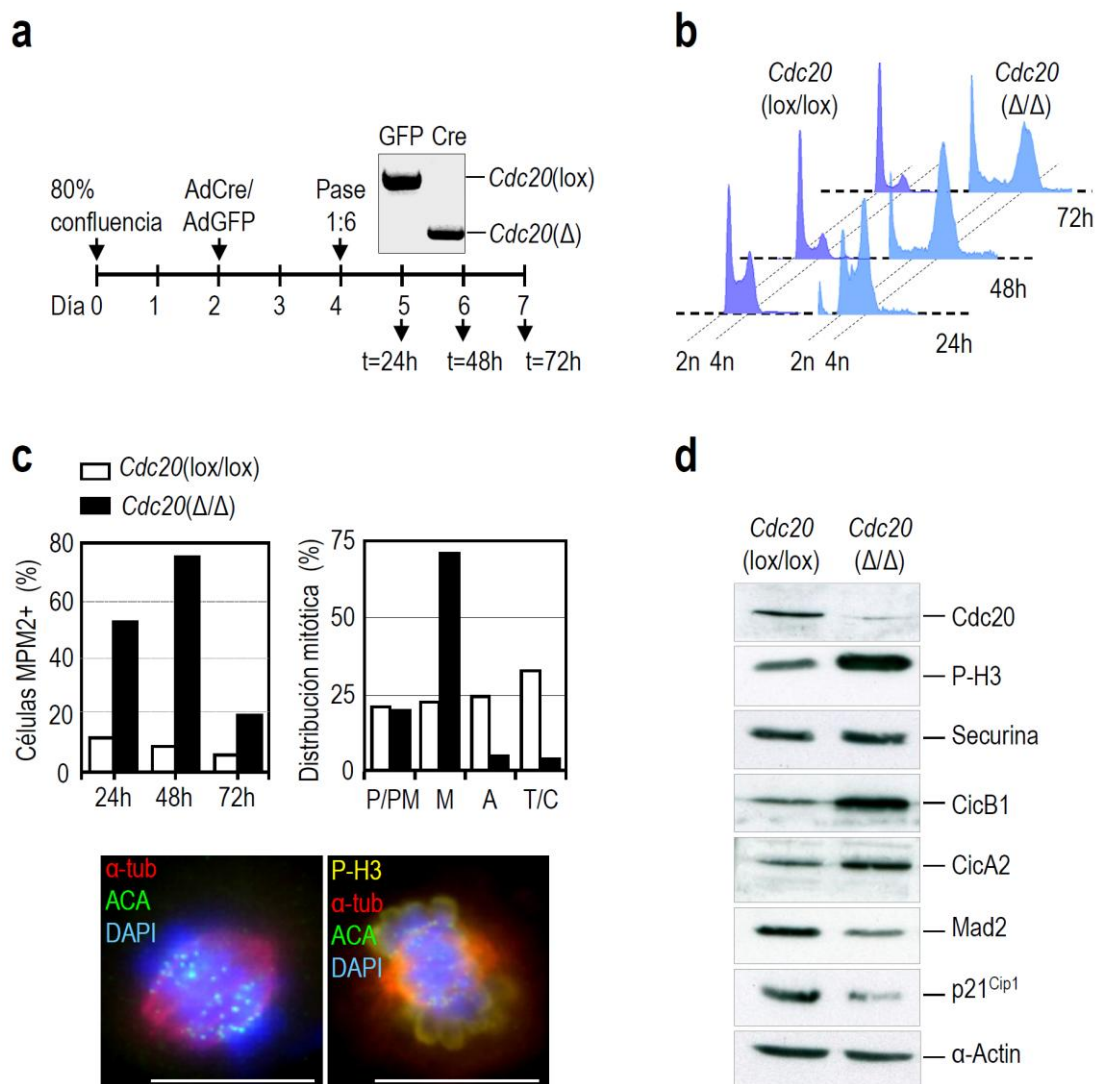


**Figura 29. Caracterización del efecto terapéutico *in vivo* de la eliminación de Cdc20 y las principales drogas antimitóticas.** Los fibrosarcomas resultantes de la inyección subcutánea de las células tumorales *Cdc20*(lox/lox); RERT(+/-Cre); H-Ras-E1A fueron caracterizados histológica e inmunohistoquímicamente tras la eliminación genética de Cdc20 o el tratamiento con los inhibidores mitóticos indicados. Los ratones fueron inyectados con BrdU 24 horas antes de su sacrificio para determinar la capacidad proliferativa del tumor. Inmunodetección de CA3 (Caspasa-3 activa). H&E, hematoxilina y eosina. PH3, fosfo-histona H3. Escala, 50  $\mu$ M o 10  $\mu$ M (magnificaciones).

## 7. La inactivación concomitante de las quinasas Mastl y Cdk1 permiten la salida de mitosis en células deficientes para Cdc20

Una vez caracterizado el fenotipo resultante de la eliminación de Cdc20 en diferentes escenarios, quisimos profundizar en el estudio del mecanismo molecular que respalda el fenotipo mitótico observado. Para ello, fibroblastos primarios de ratón *Cdc20*(lox/lox) fueron transducidos con adenovirus que expresaban tanto la proteína verde fluorescente (GFP), como la

recombinasa Cre. La expresión de la recombinasa Cre, pero no así la de GFP, dio lugar al alelo *Cdc20* knock-out ( $\Delta$ ) (Figura 30a). La eliminación de *Cdc20* provocó una importante acumulación de células en mitosis (Figura 30b), particularmente en metafase (Figura 30c). Mientras las células deficientes para *Cdc20* mostraron niveles significativamente altos de ciclina A y ciclina B, la estabilización de los niveles proteicos de securina no fue tan evidente. En contraposición, los niveles de las proteínas Mad2 y p21<sup>Cip1</sup> aparecieron disminuidos (Figura 30d). Si bien los bajos niveles de p21<sup>Cip1</sup> indican la existencia de otros mecanismos responsables de la proteólisis de este inhibidor, los niveles proteicos de Mad2 en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) sugieren un checkpoint de unión al huso completamente satisfecho.

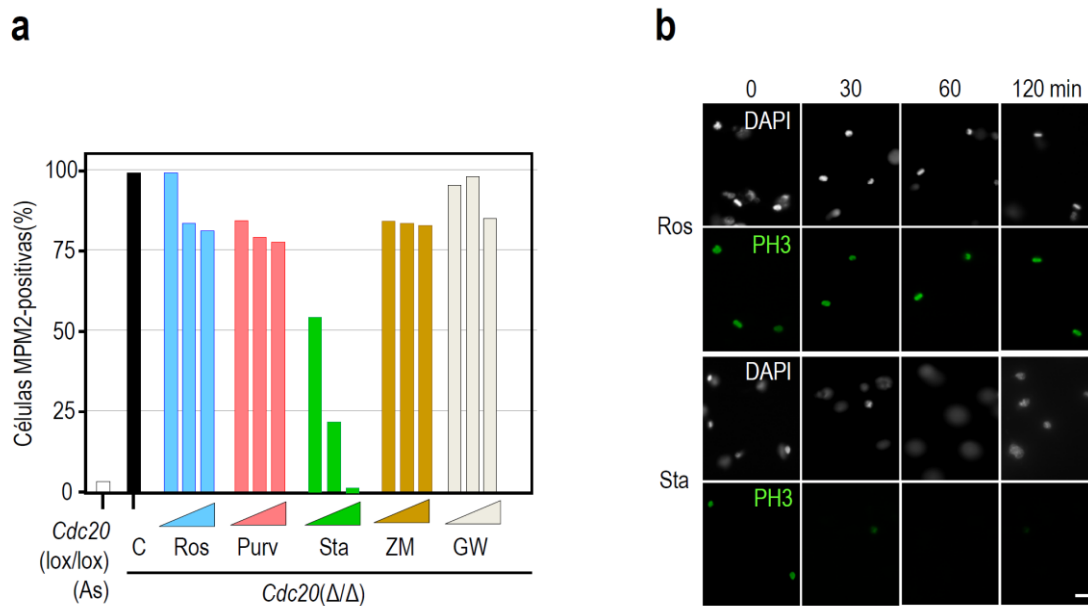


**Figura 30. Caracterización molecular de la eliminación de Cdc20.** (a). Esquema del protocolo seguido para inducir la eliminación condicional de Cdc20 en MEFs primarios. Los fibroblastos fueron infectados con adenovirus que expresan la recombinasa Cre o la proteína GFP cuando estos estuvieron en confluencia. 48 horas después de la infección, las células fueron sembradas a baja densidad y analizadas a diferentes horas. PCR mostrando la eliminación del exón 2. (b). Análisis del contenido de DNA (Eje X, ioduro de propidio; eje Y, número de células) mediante citometría de flujo. (c). A t=48h la mayor parte de las células vivas son positivas para el marcador mitótico MPM2. Las células mitóticas se encuentran mayoritariamente paradas en metafase (M) y se observan pocas figuras mitóticas en anafase (A), telofase (T) o citocinesis (C). P/PM, profase y prometafase (n=500, por cada genotipo). Imágenes representativas de células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) en metafase. Rojo,  $\alpha$ -tubulina; verde, centrómeros (ACA); amarillo, fosfo-histona H3 (PH3); azul, DNA. (d). Inmunodetección mediante Western Blot de las proteínas indicadas a t=48h en fibroblastos de genotipo *Cdc20*(lox/lox) y *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ). Escala, 10  $\mu$ M.

Tanto la dispensabilidad de securina en mamíferos (Mei et al. 2001) como el modesto incremento observado en sus niveles en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ), sugieren a la ciclina B1 como el único sustrato esencial de Cdc20 en células de mamífero. El único papel adscrito a la proteína ciclina B1 es su papel como activador de la principal quinasa mitótica Cdk1. Dadas estas premisas, podemos deducir que el fenotipo de parada en metafase de las células deficientes para Cdc20 sería únicamente consecuencia de la alta actividad quinasa de Cdk1. Estos niveles de actividad Cdk1 impedirían tanto la separación de las cromátidas hermanas por la fosforilación inhibitoria de la proteína separasa, como la salida de mitosis ya que se requiere la inactivación de las principales quinasas mitóticas. Con estos datos, nos atrevimos a especular sobre si la mera inhibición de la actividad Cdk1 sería suficiente para promover una salida eficiente de mitosis en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ). Así, decidimos evaluar el efecto de varios inhibidores específicos de Cdk. Las células deficientes para Cdc20 fueron tratadas con inhibidores de Cdk (Roscovitina y purvalanol A) e inhibidores frente a quinasas esenciales en mitosis tales como Aurora B (ZM447439) y Plk1 (GW843682X). En este mismo ensayo incluimos un inhibidor general de quinasas que presenta cierta especificidad frente a las quinasas pertenecientes a la familia AGC (Staurosporina).

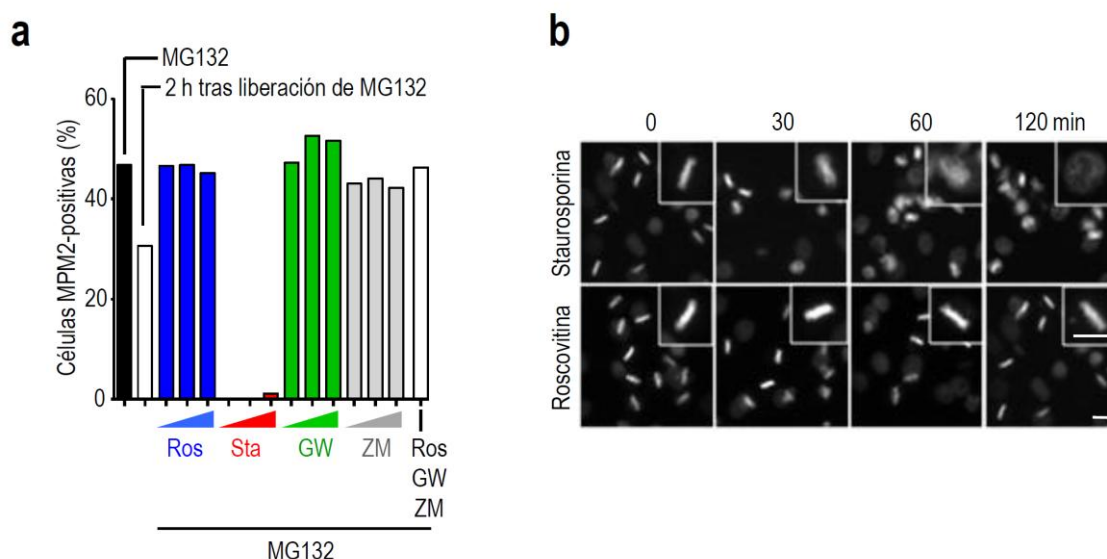
El único de los inhibidores ensayados que permitió la salida de mitosis en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ), entendiendo como salida de mitosis la pérdida de la morfología redondeada de la célula, la descondensación de los cromosomas, la formación de la envuelta nuclear y la pérdida de la señal dada por los marcadores mitóticos MPM2, fosfo-histona H3 y epítomos fosforilados por Cdk, fue la staurosporina (Figura 31a). Tanto la inhibición específica de Cdk1 como la

inhibición de dos de las principales quinasas mitóticas fueron insuficientes para inducir ninguno de los eventos anteriormente mencionados (Figura 31b).



**Figura 31. Efecto de los inhibidores de las quinasas mitóticas en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ).** (a). Las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) fueron tratadas, 48 horas después de la inducción de la recombinasa Cre, con concentraciones crecientes (10, 50 y 100  $\mu$ M) de roscovitina (Ros), purvalanol A (Purv), el inhibidor de Plk1 GW843682X (GW) y el inhibidor de Aurora B ZM447439 (ZM). Las concentraciones utilizadas de staurosporina (Sta) fueron 0.1, 1 y 10  $\mu$ M. El índice mitótico fue determinado 3 horas después del inicio del tratamiento por la inmunodetección mediante citometría de flujo del marcador mitótico MPM2. El porcentaje de células mitóticas fue normalizado respecto de las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) tratadas con DMSO (C). Un cultivo de células asincrónicas fue utilizado como control negativo del experimento (As). (b). Imágenes representativas de las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) antes (0 min) o 30, 60 y 120 minutos después del tratamiento con 50  $\mu$ M de roscovitina o 5  $\mu$ M de staurosporina. Blanco, DNA; Verde, fosfo-histona H3 (PH3). Escala, 20  $\mu$ M.

Para cerciorarnos de que este fenómeno no era específico de un tipo celular particular, realizamos un ensayo similar utilizando células humanas Hela. Las células Hela fueron paradas permanentemente en mitosis mediante su tratamiento con nocodazol y posteriormente con el inhibidor del proteosoma MG132. Al igual que lo observado en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ), el tratamiento con roscovitina, el inhibidor de Plk1, el inhibidor de Aurora B o una combinación de los tres no indujo ninguna de las características propias de la salida de mitosis (Figura 32a). Solo el tratamiento con staurosporina provocó una eficiente salida de mitosis caracterizada por la rápida descondensación del DNA y la pérdida del marcador mitótico MPM2 (Figura 32b).

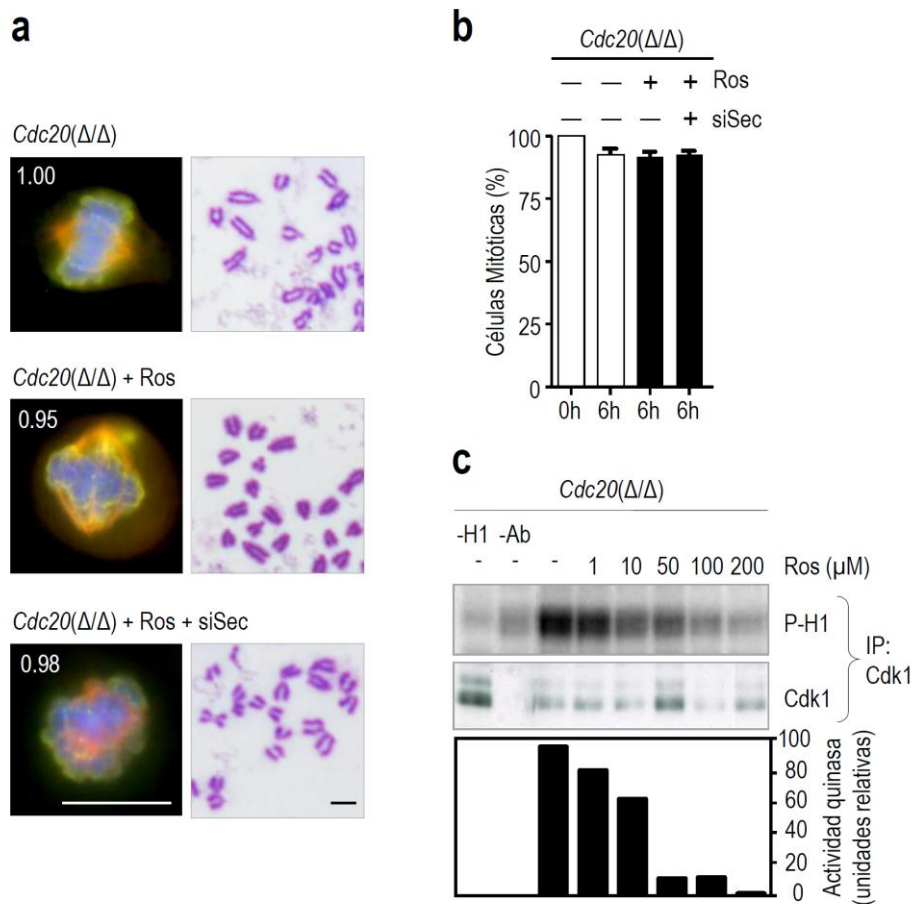


**Figura 32. Efecto de los inhibidores de las quinasas mitóticas en células humanas.** (a). Las células humanas Hela que expresan la histona H4 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) fueron tratadas consecutivamente con nocodazol y con el inhibidor del proteosoma MG132 para inducir una parada permanente en metafase. Las células mitóticas fueron tratadas con concentraciones crecientes (5, 10 y 50  $\mu$ M) de roscovitina (Ros), purvalanol A (Purv), el inhibidor de Plk1 GW843682X (GW), el inhibidor de Aurora B ZM447439 (ZM), staurosporina (Sta) y una combinación de Ros, GW y ZM a una concentración de 50  $\mu$ M cada uno. El índice mitótico fue determinado 2 horas después del inicio del tratamiento por la inmunodetección del marcador mitótico MPM2 mediante citometría de flujo. (b). Imágenes representativas monitorizando la condensación del DNA (histona H4-GFP) tras el tratamiento con roscovitina y staurosporina en la presencia del inhibidor del proteosoma MG132. Escala, 10  $\mu$ M.

Para descartar un posible papel de securina como inhibidor de la salida de mitosis, tratamos nuestras células deficientes para Cdc20 con una combinación de roscovitina y RNA de interferencia (RNAi) frente a este regulador. Ni la eliminación individual de securina, ni su combinación con una eficiente inhibición de Cdk1 (Figura 33c) provocaron la salida de mitosis en las células knock-out para Cdc20 (Figura 33b). Tras esta combinación de tratamientos, las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) mostraron una persistente parada en metafase sin separación de las cromátidas hermanas (Figura 33a).

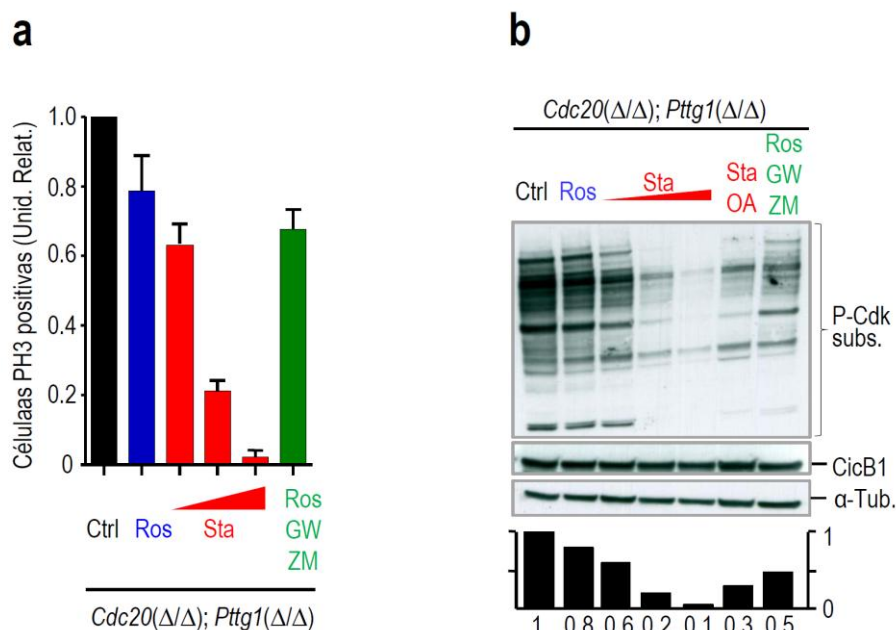
Dadas las limitaciones de la tecnología basada en RNA de interferencia y para descartar completamente un posible papel de la securina (Pttg1 en mamíferos) en la salida de mitosis, hicimos uso de los fibroblastos embrionarios de ratón portadores de la doble mutación condicional para Cdc20 y securina.





**Figura 33. Caracterización de la eliminación parcial de securina y la inhibición química de Cdk1 en las células *Cdc20(Δ/Δ)*.** (a). Fibroblastos *Cdc20(lox/lox)* fueron infectados con AdCre [*Cdc20(Δ/Δ)*] y tratados con roscovitina y RNA de interferencia frente a securina (siSec). Ninguno de estos tratamientos permite la salida de mitosis en las células deficientes para *Cdc20*. Imágenes representativas de las células tratadas con las condiciones indicadas. La proporción de células paradas en metafase es indicada tras su normalización frente a las células *Cdc20(Δ/Δ)*. Amarillo, fosfo-histona H3 (PH3); rojo,  $\alpha$ -tubulina; azul, DNA. (b). Representación gráfica del porcentaje de células mitóticas tras el tratamiento indicado. La determinación de las células mitóticas fue realizada atendiendo a la condensación de DNA que fue teñido con DAPI. (c). Ensayo quinasa para la actividad de Cdk1. La proteína Cdk1 de células *Cdc20(Δ/Δ)* fue inmunoprecipitada usando anticuerpos específicos y su actividad quinasa fue testada en presencia de las concentraciones indicadas de roscovitina, usando como sustrato la histona H1. Representación de los niveles de fosforilación de la histona H1 tras su normalización. Escala, 10  $\mu$ M (immunofluorescencia) y 2  $\mu$ M (extendido cromosómico).

Las células *Cdc20(Δ/Δ)*; *Securina(Δ/Δ)* mostraron un fenotipo de parada en metafase idéntico al observado en las células deficientes para *Cdc20*. Además, al igual que lo observado en los experimentos anteriores, la adición de roscovitina no desencadenó el inicio de ningún evento propio de la salida de mitosis (Figura 34).



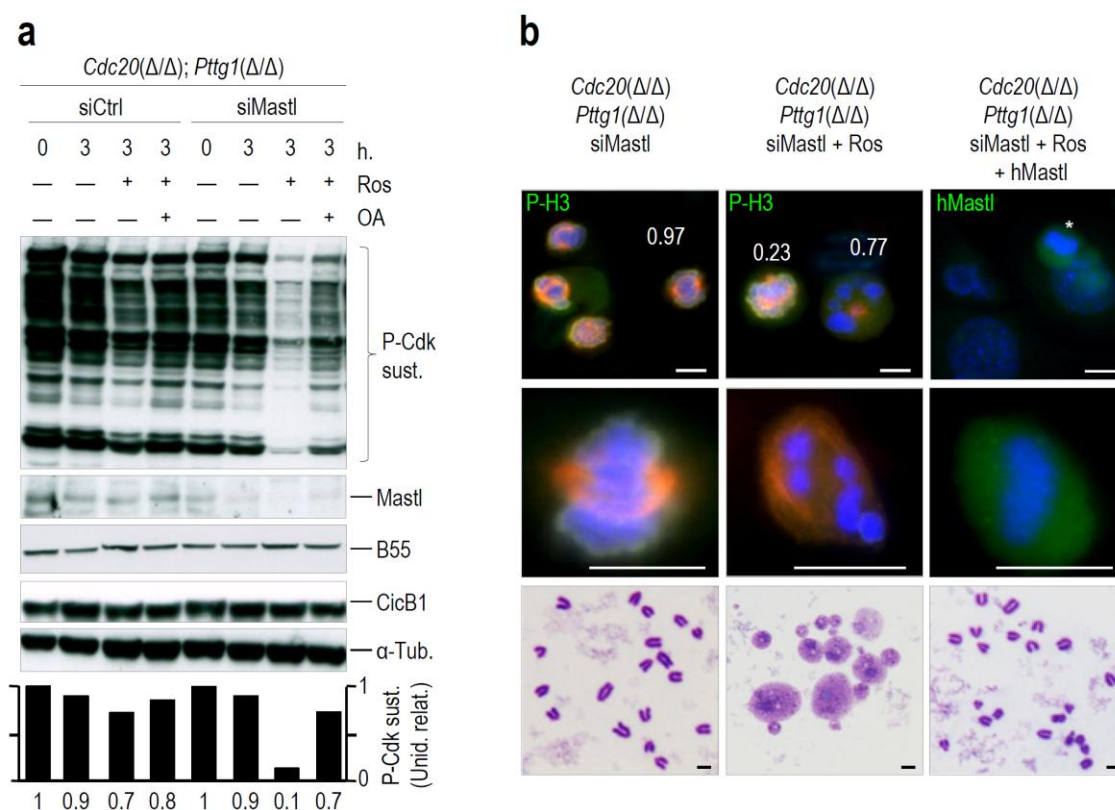
**Figura 34. Efecto de la eliminación genética de securina y la inhibición química de Cdk1 en las células *Cdc20(Δ/Δ)*.** (a). Determinación del índice mitótico mediante la inmunodetección del marcador de mitosis fosfohistona H3 (PH3) por citometría de flujo. Las células *Cdc20(Δ/Δ); Pttg1(Δ/Δ)* fueron tratadas con DMSO (Ctrl), 50 μM de roscovitina (Ros), concentraciones crecientes de staurosporina (0.1, 1, 10 μM Sta) y una mezcla de roscovitina, inhibidor de Plk1 (GW) e inhibidor de Aurora B (ZM) a una concentración de 50 μM cada uno. (b). Inmunodetección mediante western blot de los fosfo-epitopos mitóticos (P-Cdk-sust) 2 horas después de la adición de los inhibidores indicados. Representación gráfica de los niveles normalizados de p-Cdk-sust. Estos resultados muestran que, mientras la inhibición química de Cdk1 no es suficiente para inducir la salida de mitosis en las células deficientes para *Cdc20* y securina, concentraciones mínimas de staurosporina son suficientes para inducir la descondensación del DNA y la desfosforilación de las proteínas mitóticas en presencia de altos niveles de ciclina B.

Así, la inhibición de la actividad quinasa de Cdk1, al menos con roscovitina y purvalanol, y su inhibición combinada con la eliminación de securina, parece no ser suficiente para inducir la salida de mitosis en las células deficientes para el cofactor *Cdc20*. Estos resultados sugieren la existencia de otros eventos esenciales durante la salida normal de mitosis que estarían regulados por la actividad proteolítica del complejo APC/C-*Cdc20*. A pesar de que algunos autores proponen que la desfosforilación de las proteínas mitóticas durante la salida de mitosis se produce por la actividad fosfatasa residual existente en las células, los estudios realizados en organismos inferiores demuestran como la salida de mitosis es conducida por la activación específica de una fosfatasa. Nos propusimos estudiar en profundidad los mecanismos que





El hecho de que una concentración de 500nM de ácido okadaico, una concentración a la que este inhibidor inhibe preferencialmente a PP2A (Felix et al. 1990; Wu et al. 2009), prevenga la salida de mitosis por roscovitina en las células tratadas con nocodazol, sugiere a PP2A como la fosfatasa que puede mediar la salida de mitosis en mamíferos. Datos recientes obtenidos en oocitos de *Xenopus* sugieren que PP2A podría ser inactivada por la quinasa Greatwall (conocida como Mastl en mamíferos y perteneciente a la familia de quinasas AGC, la principal diana de la staurosporina). Esta inhibición garantizaría el estado mitótico mediante el mantenimiento de los fosfo-epitopos de Cdk1 (Castilho et al. 2009; Vigneron et al. 2009). Así, la salida de mitosis requeriría la inactivación de Mastl y la consecuente activación de la fosfatasa PP2A.

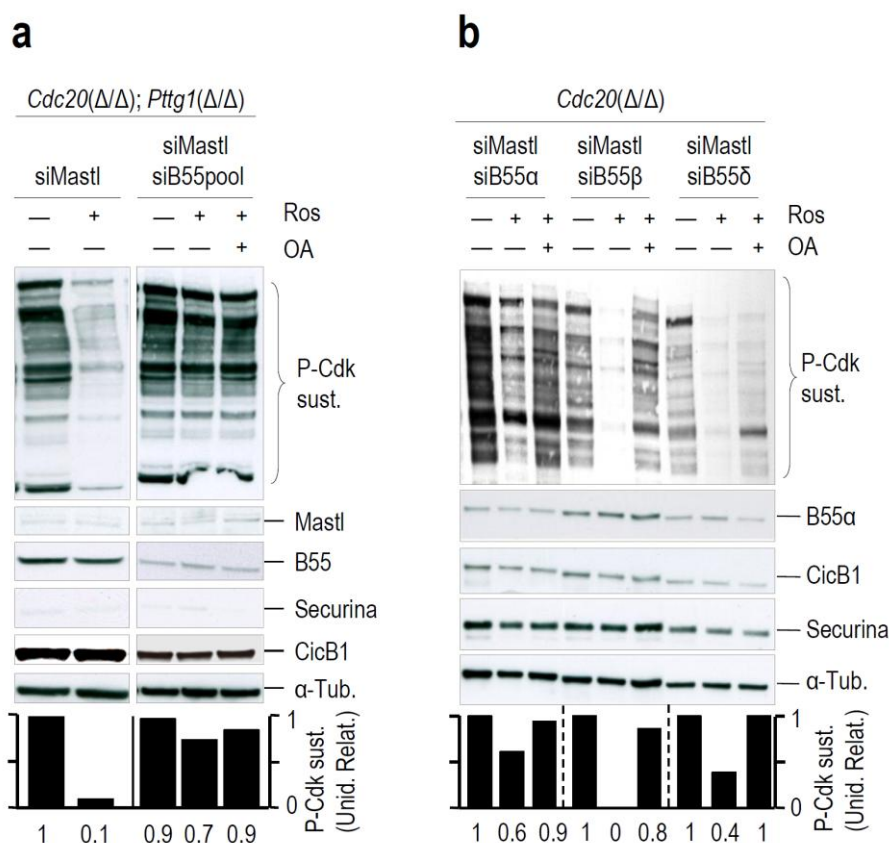


**Figura 36. La salida de mitosis en células *Cdc20(Δ/Δ)* es inducida por la inhibición combinada de Cdk1 y la quinasa Mastl.** (a). MEFs *Cdc20(Δ/Δ); Pttg1(Δ/Δ)* fueron transfectados con RNA de interferencia control (siCtrl) o frente a Mastl (siMastl) y tratados con roscovitina (Ros) y/o ácido okadaico (OA). Las células fueron analizadas 48 horas después de la expresión de Cre (0 h) o 3 horas después del tratamiento con Ros y/o OA (3h). Western blot de los fosfo-epitopos mitóticos (p-Cdk-sust.) como marcador de mitosis. Histograma de los niveles relativos de los fosfo-epitopos normalizados versus siCtrl 0h. (b). Imágenes representativas de células o extendidos cromosómicos. La proporción de células en metafase y células con descondensación de cromosomas es indicada en cada micrografía. El panel de la derecha muestra el efecto de un cDNA de Mastl humano fusionado a la proteína GFP insensible a los efectos del RNAi frente a Mastl (Verde, hMastl). Amarillo, fosfo-histona H3 (PH3); Rojo, α-tubulina; azul, DNA. Escala, 10 μM (immunofluorescencia) y 2 μM (extendido cromosómico).

Por este motivo, quisimos estudiar si la eliminación de Mastl podría cooperar para permitir la salida de mitosis en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ). Para ello, eliminamos Mastl de nuestras células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ); *Securina*( $\Delta/\Delta$ ) mediante RNA de interferencia. Como ya ha sido descrito, la eliminación parcial de Mastl condujo a una cierta ralentización en la entrada en mitosis (Burgess et al.). No obstante, la gran mayoría de las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ); *Securina*( $\Delta/\Delta$ ); RNAi Mastl alcanzaron el estadio de metafase en el que permanecieron paradas mostrando altos niveles de proteínas fosforiladas y cohesión en las cromátidas hermanas (Figura 36). Llegados a este punto, quisimos evaluar la inhibición conjunta de las quinasas Cdk1 y Mastl. El tratamiento con roscovitina de las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ); *Securina*( $\Delta/\Delta$ ); RNAi Mastl resultó en la rápida salida de mitosis caracterizada por la descondensación del DNA, la formación de la envuelta nuclear y la desfosforilación de los fosfo-epitopos mitóticos (Figura 36a). Esta rápida descondensación del DNA se produjo sin separación de las cromátidas hermanas, lo que generó células tetraploides con fragmentación nuclear (Figura 36b). El efecto de la eliminación de Mastl mediante RNA de interferencia fue específico, ya que este pudo ser rescatado mediante la transfección de las células deficientes para *Cdc20* y *securina* con un cDNA humano de Mastl insensible a los oligonucleótidos de RNA utilizados en este ensayo (Figura 36b). Estos resultados mostraron un claro sinergismo entre la inhibición química de Cdk1 y la eliminación de la quinasa Mastl en la salida de mitosis de las células deficientes para *Cdc20*.

## 8. La salida de mitosis requiere la activación del complejo PP2A-B55

El hecho de que el efecto combinado del RNAi frente a Mastl y la roscovitina sea inhibido por bajas concentraciones de ácido okadaico, sugiere una ruta molecular lineal en la que la actividad fosfatasa de PP2A quedaría regulada por Mastl en la salida de mitosis de mamíferos (Figura 36a). Estudios recientes han propuesto a B55 $\delta$  como la subunidad reguladora de PP2A en la salida de mitosis de oocitos de *Xenopus laevis*. Atendiendo a estas evidencias, nos propusimos elucidar si el complejo de desfosforilación PP2A-B55 es el responsable de conducir la salida de mitosis en mamíferos. La eliminación de todas las isoformas del gen B55 (B55 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ ) existentes en mamíferos, previno la salida de mitosis de las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ); *Securina*( $\Delta/\Delta$ ) tras la inactivación combinada de Mastl y Cdk1 (Figura 37a). Este resultado indica que PP2A, en complejo con la subunidad B55, constituye la principal fosfatasa que dirige la salida de mitosis en las células de mamíferos.

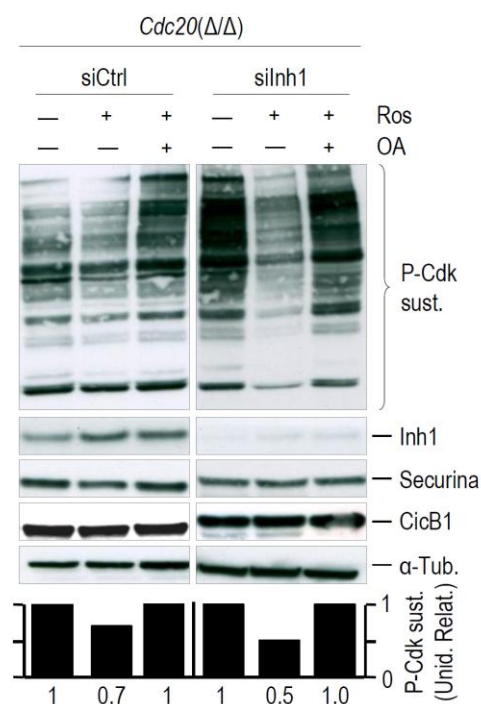


**Figura 37. La salida de mitosis en células de mamífero es inhibida por la actividad quinasa de Mastl y requiere la actividad de los complejos PP2A-B55α,δ.** (a). Fibroblastos *Cdc20(Δ/Δ); Pttg1(Δ/Δ)* fueron transfectados con RNA de interferencia frente a Mastl (siMastl) y una mezcla de RNAi frente a las diferentes isoformas del gen B55 (siB55pool). La eliminación parcial de B55 previene la salida de mitosis inducida por la eliminación de Mastl y la inhibición de Cdk1 de forma similar al tratamiento con ácido okadaico. Western blot de los fosfo-epitopos mitóticos y cuantificación de sus niveles relativos. (b). La salida de mitosis fue prevenida parcialmente mediante la utilización de RNAi específicos frente a las isoformas B55α, B55β y B55δ en células deficientes para *Cdc20* tratadas con roscovitina, siMastl y ácido okadaico. Inmunodetección mediante western blot de los fosfo-epitopos mitóticos y representación de sus niveles normalizados de manera independiente para cada isoforma eliminada del gen B55.

Mientras las subunidades B55α (Ppp2r2a) y B55δ (Ppp2r2d) se expresan en prácticamente todos los tipos celulares de mamíferos, las isoformas B55β (Ppp2r2b) y B55γ (Ppp2r2c) se expresan únicamente en sistema nervioso (Eichhorn et al. 2009). De acuerdo a estos patrones de expresión, la eliminación individual de la subunidad B55β no impidió la salida de mitosis mediada por la inhibición de Cdk1 y Mastl en fibroblastos *Cdc20(Δ/Δ)*. Sin embargo, la

eliminación de las subunidades B55 $\alpha$  y B55 $\delta$  previno la desfosforilación de los fosfo-epitopos mitóticos de manera complementaria (Figura 37b).

Como ya mencionamos en la introducción, la fosfatasa PP1 también ha sido propuesta como regulador esencial en la salida de mitosis en células embrionarias de *Xenopus laevis*. En este modelo, la desfosforilación del inhibidor-1 (Inh-1) de PP1 conduce a la completa activación de la fosfatasa y a la salida de mitosis (Wu et al. 2009). Con el objeto de evaluar un posible papel de PP1 en la salida de mitosis de mamífero, eliminamos el factor Inh-1 de nuestras células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ).

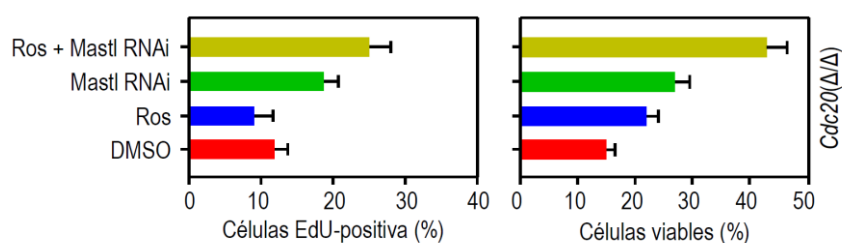


**Figura 38. PP1 participa en la salida de mitosis probablemente a través de la regulación de PP2A.** Células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) fueron transfectadas con RNA de interferencia control (siCtrl) o frente al inhibidor-1 (Inh-1) de PP1 (siInh1). La eliminación del inhibidor-1 en combinación con roscovitina resultó en la desfosforilación parcial de los fosfo-epitopos mitóticos que fue prevenida por bajas concentraciones de ácido okadaico. Immunodetección mediante western blot de los niveles de fosfo-epitopos mitóticos y cuantificación de sus niveles normalizados.

La eliminación del inhibidor-1 mediante RNA de interferencia resultó en la desfosforilación parcial de los fosfo-epitopos mitóticos en presencia de roscovitina. Esta salida de mitosis fue prevenida por una concentración de 500 nM de ácido okadaico, lo que indica que en

último término PP1 podría estar regulando la actividad de PP2A de manera directa o a través de alguno de sus reguladores.

Todos estos datos sugieren que la inhibición conjunta de Cdk1 y Mastl por el complejo APC/C-Cdc20 constituye un mecanismo general en la salida de mitosis en mamíferos. Así, mientras las células deficientes para Cdc20 mueren en mitosis tras un prolongado periodo de tiempo en metafase, las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) progresan a través de las distintas fases del ciclo celular y presentan un significativo incremento en su viabilidad tras la inhibición combinada de Cdk1 y Mastl (Figura 39). Estos resultados contienen una importante implicación terapéutica en términos de pérdida de eficacia en una posible terapia basada en la inhibición del complejo APC/C-Cdc20.



**Figura 39. La inhibición concomitante de Cdk1 y Mastl en células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) incrementa la viabilidad celular.** Células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) fueron tratadas con roscovitina y siMastl, y el nucleótido análogo EdU fue añadido al medio de cultivo de dichas células. El número de células viables (células negativas para el marcador de apoptosis annexina V) y la incorporación de EdU fueron analizados mediante citometría de flujo. Estos resultados muestran un incremento en la viabilidad celular y la duplicación del DNA en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) tratadas con las condiciones que permiten la salida de mitosis.



Discusión





## Discusión

Muchos son los estudios que han sido realizados sobre el cofactor Cdc20 desde su descubrimiento por Lee Hartwell hace ya 27 años. Cdc20 fue descrito en estudios genéticos seminales como un gen esencial para la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Zachariae et al. 1998b). La falta de Cdc20 resultó en la incapacidad de las células para ejecutar de manera eficiente la transición metafase-anafase (Hartwell et al. 1973). A pesar de la profusa caracterización de este cofactor en organismos inferiores y de la detallada descripción de su mecanismo molecular, poco se sabe sobre su verdadera importancia en organismos complejos. La eliminación de Cdc20 en células de mamífero mediante RNAi ha arrojado datos contradictorios sobre su requerimiento en la división celular. Mientras algunos trabajos sugieren la dispensabilidad de este regulador (Clarke 2009), otros le otorgan un papel clave en la ejecución de la mitosis (Wolthuis et al. 2008).

La abolición de los principales eventos que permiten la progresión mitótica ha sido un concepto clásico en la terapia de los principales desórdenes proliferativos. Cdc20 constituye el principal activador mitótico del complejo de ubiquitinación que permite la transición lineal y ordenada a través de las distintas fases de la mitosis. Por este motivo, la eliminación de la actividad proteolítica mediada por APC/C representa una diana de sumo interés en la terapia anticancerosa (Kaestner and Bastians).

Tanto la contradicción existente sobre el papel de esta proteína en células de mamíferos, como la interesante posibilidad de su uso como diana en la terapia antitumoral, hicieron de Cdc20 una molécula muy atractiva para su estudio en profundidad. Dado el potencial que suponen los modelos animales modificados genéticamente como herramienta de estudio, nos propusimos como proyecto de tesis doctoral la generación de un modelo de ratón condicionalmente deficiente para el gen Cdc20. Este trabajo ha aportado datos inequívocos acerca de la relevancia biológica de Cdc20 y su valor como diana en una hipotética terapia anticancerosa. Sin embargo, muchas son las oportunidades de conocimiento que han quedado abiertas y que permanecen aún por estudiar.

## 1. Cdc20, un gen esencial.

La eliminación genética de Cdc20 resulta en la parada permanente en metafase tanto en células somáticas como en células embrionarias. La ausencia de una afectación profunda en el ciclo celular de las células deficientes para Cdh1 (Garcia-Higuera et al. 2008) sugiere que Cdc20 puede sustituir a Cdh1 al menos para ejecutar una salida eficiente de mitosis. Dada la falta de especificidad que Cdh1 y Cdc20 muestran para muchos de sus sustratos, la dispensabilidad de Cdh1 nos hizo pensar en la posibilidad de que ambos cofactores pudiesen reemplazarse mutuamente. Los resultados mostrados en esta tesis han descartado esta posibilidad. La eliminación de Cdc20 conduce a una parada permanente en mitosis que en ningún caso es prevenida por Cdh1. A pesar de que Cdh1 es capaz de promover la degradación de los dos sustratos principales de Cdc20, ciclina B y securina (S. J. Sigrist and Lehner 1997; Zur and Brandeis 2001), el mecanismo que regula la unión de Cdh1 al complejo APC/C inhabilita a este cofactor para sustituir a Cdc20. Al igual que muchas otras proteínas, Cdh1 y Cdc20 son fosforiladas al inicio de la mitosis por la quinasa Cdk1 (Zachariae et al. 1998a) (Chung and Chen 2003). Mientras la fosforilación de Cdc20 cataliza su unión al complejo APC/C, la fosforilación de Cdh1 favorece el efecto contrario. Una vez APC/C-Cdc20 inactiva a Cdk1 y las fosfatasa mitóticas son activadas, Cdh1 recupera su capacidad de unión al complejo APC/C y desencadena los últimos eventos necesarios en la salida de mitosis. Así, la activación permanente de Cdk1 que resulta tras la eliminación de Cdc20 inhabilita funcionalmente a Cdh1 para compensar la falta del cofactor mitótico. El mecanismo por el que se regula la unión de los cofactores al complejo APC/C es responsable de que, mientras la falta de Cdh1 puede ser compensada por la actividad de Cdc20, la eliminación del cofactor mitótico conlleva la pérdida de la capacidad proteolítica de la célula, que tiene como consecuencia la parada permanente en mitosis (Manchado et al.).

El complejo APC/C-Cdc20 es el encargado de desencadenar dos eventos fundamentales para la progresión mitótica: la activación de la proteína separasa que permite la separación de las cromátidas hermanas; y la inactivación de Cdk1 que da inicio a la salida de mitosis. Ambos eventos son desencadenados mediante la degradación de securina y ciclina B, que han sido definidos a partir de estudios en levaduras como los sustratos esenciales de Cdc20 (Shirayama et al. 1999; Thornton and Toczyski 2006). La securina es una chaperona que participa en la inhibición de separasa, que a su vez, es la proteína encargada de liberar los complejos de cohesina que mantienen la unión de los cromosomas duplicados. A pesar de que

la segregación fidedigna del material genético representa un proceso clave en el mantenimiento de la vida, la securina ha demostrado ser un gen dispensable. Su eliminación, tanto en organismos inferiores como en mamíferos, ha resultado completamente inocua (Mei et al. 2001; Yamamoto et al. 1996). No obstante, es importante destacar que la expresión de un mutante no degradable de Securina impide la correcta separación de las cromátidas hermanas (Zou et al. 1999; Zur and Brandeis 2001). Todos estos resultados sugieren la existencia de otros mecanismos redundantes que regularían de manera precisa el proceso que conlleva la repartición del material genético. Estudios recientes han demostrado como el principal mecanismo adicional que permite la regulación de la actividad de la separasa es su fosforilación por Cdk1. La fosforilación de separasa por sí sola no es suficiente para abrogar su actividad (Stemmann et al. 2001). Cdk1, en un segundo paso, es capaz de formar a través de la ciclina B un complejo heterotrimérico con separasa, que es el responsable de la pérdida total de la actividad de esta proteína (Gorr et al. 2005). En esta tesis, al igual que previamente ha sido descrito, hemos puesto de manifiesto la dispensabilidad de securina en el control de la segregación cromosómica. La eliminación condicional de securina en un fondo genético nulo para Cdc20 resultó en la parada en metafase sin separación de las cromátidas hermanas. El mismo resultado fue obtenido cuando la eliminación de securina se combinó con la inhibición de la actividad de Cdk1 (Figura 36b). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren un modelo en el que la activación de separasa vendría dada por la inactivación de securina y el desensamblaje del complejo heterotrimérico separasa-ciclina B-Cdk1. Ambos sucesos serían estrictamente necesarios para una correcta segregación del material genético duplicado y dependientes de la actividad proteolítica del complejo APC/C-Cdc20. Este modelo permitiría explicar porque ni la eliminación individual de securina, ni su eliminación combinada con una eficiente inhibición de Cdk1 es suficiente para desencadenar la separación de las cromátidas hermanas. No es sorprendente que un proceso tan esencial para las células como es la repartición del material genético presente diferentes niveles de regulación que actúen de manera complementaria.

Una vez propuesto un modelo de inicio de la anafase basado exclusivamente en la actividad proteolítica de APC/C-Cdc20, nos surge la pregunta de cómo los embriones deficientes para Cdc20 pueden conseguir una separación total de las cromátidas hermanas en ausencia de actividad proteolítica. En primer lugar, es importante destacar que la disociación de las cromátidas solo fue observada en los embriones *Cdc20*(-/-) que permanecieron parados en metafase durante un periodo prolongado de tiempo. En ninguno de los otros tipos celulares donde la eliminación genética de Cdc20 fue ensayada pudimos observar este fenotipo. En

segundo lugar, un dato muy clarificador es que solo los embriones en estadio de desarrollo de dos células sobrevivieron más de un día a la falta de Cdc20. En el resto de células, la eliminación de Cdc20 indujo una rápida muerte celular por apoptosis. Llegados a este punto y teniendo en cuenta las premisas anteriores, es difícil pensar en un mecanismo celular activo que haya sido el responsable de la separación de las cromátidas hermanas en los embriones *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ). Mas bien parece un mecanismo pasivo como consecuencia de dos hechos claves: la parada extremadamente prolongada en metafase y la sugerente ausencia de muerte celular por apoptosis en embriones de estadios tempranos de desarrollo. Recientemente ha sido propuesto el concepto de 'fatiga en la cohesión cromosómica'. Este concepto ha sido definido a partir de las observaciones realizadas en células humanas paradas permanentemente en metafase mediante la inhibición química del proteosoma. Bajo estas circunstancias, las células experimentan la separación de las cromátidas hermanas en presencia de altos niveles de ciclina B y securina (comunicación personal del Dr. G. Gorbsky, Cell Cycle & Cancer Biology, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City). Dada la similitud de ambos escenarios y la particularidad de los mismos, mantenemos nuestra convicción acerca de que es esta 'fatiga en la cohesión cromosómica' la explicación más convincente del fenotipo observado. Sin embargo, es importante dejar claro que esta explicación es una mera especulación que no permite excluir la existencia de otros posibles mecanismos. Así, la separación de las cromátidas en estas situaciones particulares podría deberse a la capacidad de Plk1 para fosforilar no solo a las cohesinas que se encuentran en los brazos de los cromosomas (Weitzer and Uhlmann 2002), sino también a las cohesinas centroméricas que mantienen la cohesión cromosómica en metafase.

Como anteriormente hemos dicho, la eliminación de Cdc20 provoca una parada irreversible en mitosis. Es bien conocido que la falta de segregación cromosómica en ningún caso acarrea la parada permanente en metafase (Nasmyth 2005). Uno de los ejemplos más ilustrativo que avala esta afirmación es el ratón deficiente para el gen de la separasa. Esta mutación impide la esencia del ciclo celular, que es la transmisión fidedigna de la información genética de una célula a sus dos células hijas. A pesar de que esta deficiencia es incompatible con la vida del animal, la eliminación condicional del gen en células no impide recapitular todos los eventos propios de la mitosis. Así, las células deficientes para la separasa progresan a lo largo del ciclo celular, duplicando su DNA y ejecutando una mitosis sin segregación del material genético. Estas mitosis aberrantes conducen a la generación de células poliploides que son perfectamente viables (Wirth et al. 2006). Este ejemplo y muchos otros, nos hacen pensar que

no es el control de la segregación cromosómica la pieza clave que hace de Cdc20 un gen esencial. Por eso, si no es la segregación cromosómica, ¿Qué hace a Cdc20 un gen fundamental? La respuesta es sencilla, la no degradación de ciclina B, no solo no impide el inicio de la anafase, sino que impide un evento clave en la salida de mitosis, la inactivación de Cdk1 (Ghiara et al. 1991). La eliminación genética de Cdc20 resulta en la presencia mantenida de elevados niveles de ciclina B que son los responsables de la parada persistente en mitosis y de la esencialidad de Cdc20.

A pesar de que son muchos los trabajos que han propuesto la dispensabilidad de Cdc20 en células de mamíferos (Baumgarten et al. 2009), la eliminación genética de este cofactor en organismos complejos nos ha permitido demostrar el requerimiento de Cdc20 en todas las células que se encuentran dentro del programa de proliferación. Cdc20 permite desencadenar eventos básicos que garantizan la progresión lineal a través de la mitosis. De esta manera, la falta de este cofactor conduce a una parada en mitosis que irreversiblemente conlleva a la muerte celular por apoptosis tanto de células somáticas como de células progenitoras.

## 2. ¿Es Cdc20 una buena diana en la terapia contra el cáncer?

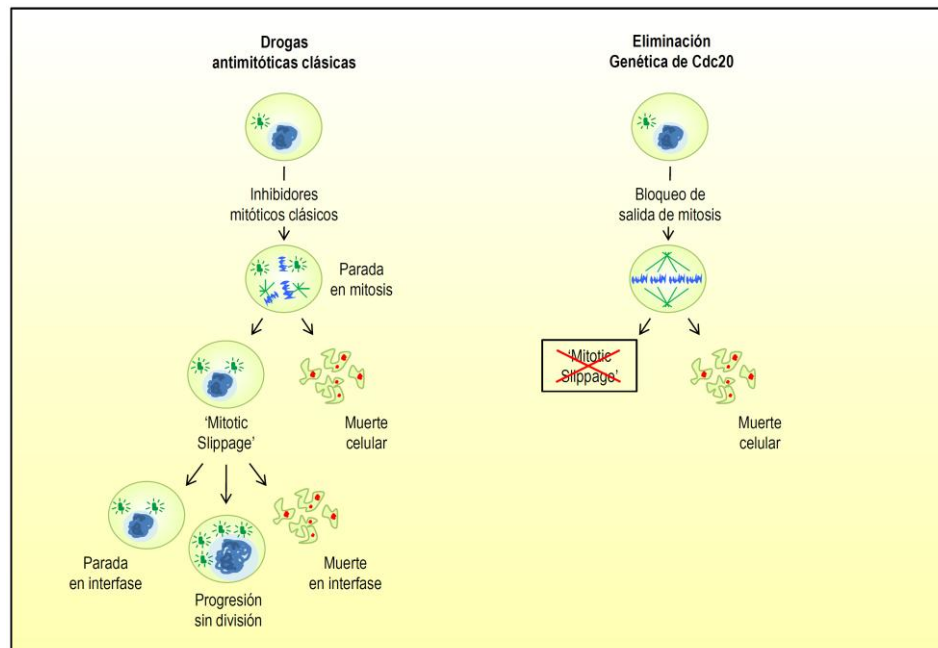
El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la proliferación descontrolada de las células malignas. En nuestro trabajo hemos comprobado que la eliminación de Cdc20 tiene severas consecuencias en la capacidad proliferativa de las células tumorales. Este resultado está en consonancia con los trabajos que han postulado la salida de mitosis como una mejor diana terapéutica que las dianas mitóticas actuales (Huang et al. 2009). La toxicidad resultante de la eliminación de Cdc20 ha demostrado ser mucho más letal para las células tumorales que la conseguida por las actuales drogas antimitóticas o los recientes inhibidores desarrollados frente a Plk1 o la quinesina Eg5. Esta diferencia radica en la siguiente observación: mientras la eliminación de Cdc20 conduce a una parada permanente en mitosis que irreversiblemente está avocada a la muerte celular, los principales inhibidores mitóticos inducen una significativa parada en mitosis de la que una gran mayoría de las células consiguen escapar. Por tanto, la pregunta clave es ¿cómo las células tumorales escapan de la parada inducida por las drogas clásicas? Probablemente, el ser capaz de contestar a esta pregunta nos ayude a entender los eventos subyacentes que hacen de la eliminación de Cdc20 un mecanismo tan eficaz como freno mitótico. El mecanismo de acción de las principales drogas antimitóticas es

bien conocido, todas ellas actúan provocando una activación sostenida del punto de control del huso mitótico o SAC que mantiene inhibido al complejo APC/C-Cdc20 (Rieder and Maiato 2004). Sin embargo, existen muchas evidencias que apuntan a que la inhibición de este complejo proteolítico por el SAC no es completa (Zeng et al.). Bajo estas circunstancias, Cdc20 facilita una lenta degradación de ciclina B que finalmente desencadena la salida de mitosis (Brito and Rieder 2006). Este proceso de adaptación ha sido denominado '*mitotic slippage*' y constituye uno de los principales mecanismos de resistencia que presentan las células tumorales tratadas con inhibidores mitóticos. Las células que experimentan este *mitotic slippage* alcanzan la fase G1 como células tetraploides, donde el status de p38 / p53 determina el destino las mismas (Andreassen et al. 2001; Bacus et al. 2001). Mientras las células deficientes para p38 / p53 experimentan muerte celular o senescencia, las células competentes inician un nuevo ciclo de división celular.

Son varios los determinantes que afectan a la eficacia de las actuales drogas antimitóticas. Gascoigne y Taylor han propuesto un interesante modelo basado en la lucha de dos mecanismos moleculares contrapuestos que permite predecir el destino de las células tratadas. En este modelo compiten dos mecanismos con sentidos opuestos: la continua degradación de ciclina B y la puesta en marcha de la maquinaria apoptótica. Así, mientras el *mitotic slippage* ocurre cuando los niveles de ciclina B se reducen por debajo de un nivel crítico, la muerte en mitosis sucede cuando las rutas pro-apoptóticas alcanzan un determinado nivel de acción. Durante la parada sostenida en mitosis ambos mecanismos se mantienen activos y el destino de la célula es marcado por el mecanismo que prevalece (Gascoigne and Taylor 2008, 2009). En base a este modelo, es fácil razonar como el bloqueo de la salida de mitosis constituye un mecanismo más eficaz para inducir muerte celular que el mecanismo molecular en el que se sustenta la actividad farmacológica de las actuales drogas antimitóticas. Contrariamente al tratamiento con los inhibidores mitóticos, las células deficientes para Cdc20 experimentan una parada persistente en metafase caracterizada por los altos niveles de ciclina B. Por lo tanto, la insensibilidad de las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ) a este mecanismo de adaptación permite inclinar el equilibrio de los mecanismos contrapuestos del lado de la muerte celular y es responsable del valor terapéutico de la eliminación de este cofactor (Figura 40).

Es lógico pensar que si el principal mecanismo de resistencia que presentan las células tumorales frente a los inhibidores mitóticos se basa en la degradación de ciclina B, el bloqueo de

ésta degradación mediante la eliminación de Cdc20 resultaría una estrategia antitumoral más eficaz. Entonces, ¿qué hace al efecto de la eliminación de Cdc20 un resultado tan atractivo?



**Figura 40. El bloqueo de la salida de mitosis como estrategia antitumoral.** Tanto las drogas antimitóticas clásicas, como los nuevos inhibidores mitóticos inducen una parada sostenida en mitosis a través de la actividad del SAC. Muchas de las células tumorales son capaces de eludir esta parada mediante la progresiva degradación de la ciclina B. Este mecanismo de adaptación ha sido denominado 'mitotic slippage' y resulta en una importante reducción del efecto antitumoral de estas drogas. La estabilización de los niveles de ciclina B tras la eliminación de Cdc20 conduce a un bloqueo permanente de la salida de mitosis. Esta estrategia ha demostrado una gran eficacia induciendo muerte celular en mitosis ya que es insensible a este *mitotic slippage*.

Son muchos los trabajos que han propuesto que la letalidad provocada por los principales inhibidores antimitóticos es dependiente de la señal emitida por el SAC (Tao et al. 2005) (Sudo et al. 2004). El hecho de que la muerte celular inducida por la falta de Cdc20 sea independiente de la actividad de este punto de control, sugiere que la apoptosis desencadenada tras los diferentes tratamientos antimitóticos depende de la parada en mitosis y no del daño causado en el huso mitótico. Este interesante resultado propone que durante la detención en mitosis e independientemente del status del SAC, las células van acumulando lentamente señales proapoptóticas que una vez alcanzan un nivel crítico disparan irreversiblemente la muerte celular (Figura 40).

A pesar de que este resultado aporta luces sobre la relación existente entre las drogas antimitóticas y la muerte celular que provocan, poco o nada se sabe acerca de los mecanismos responsables de esta apoptosis. Existe una vasta literatura que aporta datos contradictorios sobre la implicación de Cdk1 como desencadenante de la muerte celular (Allan and Clarke 2007; Castedo et al. 2002; Shen et al. 1998). No son menos los estudios que, con el mismo éxito, se han realizado para tratar de identificar las rutas proapoptóticas desencadenadas tras el tratamiento con los inhibidores mitóticos (Bergstralh and Ting 2006; Huang et al. 2009). Aunque la elucidación de esta ruta molecular supone un fascinante desafío, el conocimiento de la naturaleza de esta vía no es necesario para valorar la extrema eficacia que supone la eliminación de Cdc20 como inductor de muerte en células tumorales.

Llegados a este punto, nos tenemos que preguntar si es viable una terapia basada en la inhibición de Cdc20. A priori, varios son los puntos que supondrían un obstáculo a una terapia con estas características. La principal limitación que tendría una hipotética terapia basada en la inhibición del complejo APC/C-Cdc20 es la predecible toxicidad para el amplio espectro de células que proliferan en un individuo adulto. Si bien la eliminación de Cdc20 ha resultado letal durante el desarrollo embrionario y en ratones jóvenes, la ablación de Cdc20 en individuos adultos fue compatible con la vida de un 25% de los ratones ensayados. Este resultado contiene importantes implicaciones terapéuticas, ya que indica que la letalidad de Cdc20 se ve ampliamente aminorada en situaciones en las que la proliferación está atenuada, tal y como sucede en etapas avanzadas de la edad. No obstante, son muchas las estrategias que pueden hacer de la inhibición de Cdc20 una terapia eficaz que sea compatible con la toxicidad que se le supone. Una característica particular de las células tumorales es que, tras el tratamiento con inhibidores mitóticos, presentan una mayor sensibilidad para experimentar muerte celular en mitosis que las células no transformadas (Brito and Rieder 2009; Shi et al. 2008). Esta particularidad hace que la inhibición parcial del complejo APC/C-Cdc20, en una terapia combinada con las drogas antimitóticas clásicas, suponga una importante ventaja en términos de selectividad terapéutica (Rieder and Medema 2009). La ralentización de la degradación de ciclina B tras la inhibición de Cdc20 proveería a la célula tumoral, pero no a la célula no transformada, del tiempo necesario para alcanzar el nivel de señal proapoptótica requerido para desencadenar la muerte celular. La mayor tendencia de las células tumorales a experimentar apoptosis le conferiría a esta estrategia un carácter selectivo frente a las células tumorales.



En la misma dirección, recientes estudios realizados en modelos de ratón han demostrado como la combinación de un ayuno prolongado con una quimioterapia convencional, reduce drásticamente los efectos adversos del tratamiento, pero mantiene su eficacia frente a las células tumorales (Raffaghello et al. 2008). El tratamiento conjunto con inhibidores de Cdk4/2 e inhibidores mitóticos permite proteger a las células normales de la toxicidad propia de la quimioterapia. Así, mientras las células normales sufren una parada reversible en G1, la deficiencia para pRb facilita que las células tumorales alcancen el estadio mitótico donde experimentan la muerte celular por apoptosis (Blagosklonny and Pardee 2001). Todas estas estrategias permitirían beneficiarse de las bondades de una hipotética terapia basada en la inhibición de Cdc20 mediante la protección selectiva de las células no tumorales.

El segundo punto crítico de este apartado nace de la siguiente pregunta, ¿es posible mimetizar químicamente los efectos resultantes de la eliminación de Cdc20? Desde un punto de vista farmacológico, la inhibición química del complejo APC/C-Cdc20 es mucho menos abordable que la inhibición de una quinasa o una fosfatasa. Sin embargo, los importantes avances que se están realizando en la determinación de la estructura tridimensional de este complejo están aportando luz para, en un futuro no muy lejano, poder abordar con confianza el desarrollo de potentes inhibidores selectivos (Herzog et al. 2009). A pesar de que es difícil prever la eficacia de un posible peptidomimético que inhiba la actividad de Cdc20, los primeros resultados obtenidos tras la inhibición química del APC/C nos hacen ser optimistas de cara a un hipotética terapia basada en la inhibición selectiva de Cdc20 (Zeng et al.).

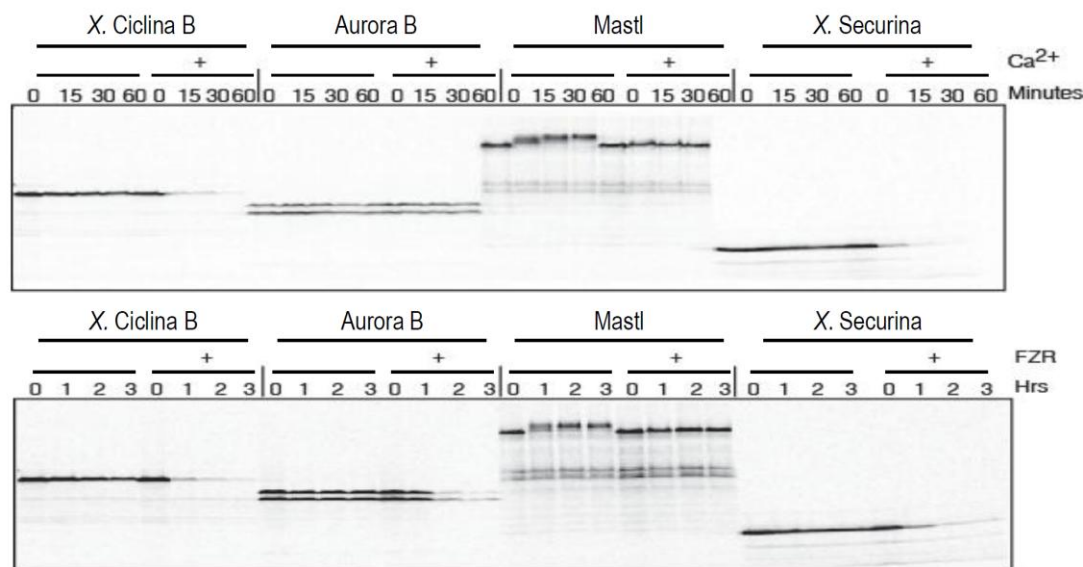
Respondiendo a la pregunta que nos planteábamos al inicio de este apartado, podemos decir que, aunque el camino que aún falta por recorrer es largo si pensamos en una posible terapia basada en la inhibición de Cdc20, los resultados de esta tesis son una buena muestra de que el bloqueo de la salida de mitosis, mediante la inactivación de Cdc20, constituye una estrategia sumamente eficaz en la inducción de muerte celular, incluso en células tumorales donde las principales rutas apoptóticas están abrogadas por la deficiencia de genes tan relevantes como p53 o pRb.

### 3. ¿Tiene Cdc20 su talón de Aquiles? Requerimientos moleculares de la salida de mitosis en mamíferos

Conseguir una salida de mitosis eficiente en una célula knock-out para Cdc20 representa un reto tremendamente estimulante por dos motivos fundamentales: Por un lado, este hallazgo supondría dilucidar los verdaderos requerimientos moleculares que una célula de mamífero tiene que cumplimentar a la hora de finalizar la división celular. Por otro lado, significaría entender un posible mecanismo de adaptación en una hipotética terapia basada en la inhibición de Cdc20.

Algunos trabajos han sugerido que la salida de mitosis en mamíferos en presencia de inhibidores del proteosoma es satisfecha por la mera inhibición de Cdk1 (Potapova et al. 2006). Sin embargo, existe una gran controversia en el campo debido a los diferentes resultados observados en función de la potencia y la especificidad del inhibidor utilizado (Skoufias et al. 2007). Mientras la roscovitina resulta ineficiente para modificar el estado mitótico de las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ), la inhibición conjunta de Cdk1 y *Mastl* induce una rápida salida de mitosis dependiente del complejo PP2A-B55 $\alpha,\delta$ . Estos resultados indican que la desfosforilación de las proteínas mitóticas no depende únicamente de la inhibición de Cdk1, sino que se requiere también la activación de las fosfatasa mitóticas.

La salida de mitosis en levaduras es conducida por dos rutas que penden únicamente de la actividad proteolítica del complejo APC/C-Cdc20 (Visintin et al. 1997). Por un lado, Cdc20 inhibe la actividad quinasa de Cdk1 mediante la degradación de ciclina B (Lim et al. 1998; Sudakin et al. 1995). Por otro lado, favorece la actividad fosfatasa de Cdc14 mediante la activación de separasa (Stegmeier et al. 2007). Nuestros datos, al igual que lo que sucede en levaduras, sugieren que el papel de Cdc20 en la salida de mitosis de mamíferos no se restringe a la mera inactivación de Cdk1. Cdc20 jugaría un papel muy importante en la activación del complejo PP2A-B55 a través de la inactivación de *Mastl*. Llegados a este punto, parece obvio el paralelismo existente entre el complejo heterodimérico ciclina B-Cdk1 y *Mastl*-PP2A. Por eso, no parece descabellado un modelo donde la salida de mitosis fuese dependiente, no solo de la degradación de ciclina B, sino también de la inactivación de *Mastl* por el complejo APC/C-Cdc20. A pesar de que *Mastl* reúne todas las características propias de los sustratos del complejo APC/C, ya que contiene varios dominios de reconocimiento/degradación D-Box y KEN box, hemos podido comprobar mediante ensayos de degradación *in vitro* que *Mastl* no está sujeto a la regulación proteolítica ni por Cdc20 ni por Cdh1 (Figura 41).

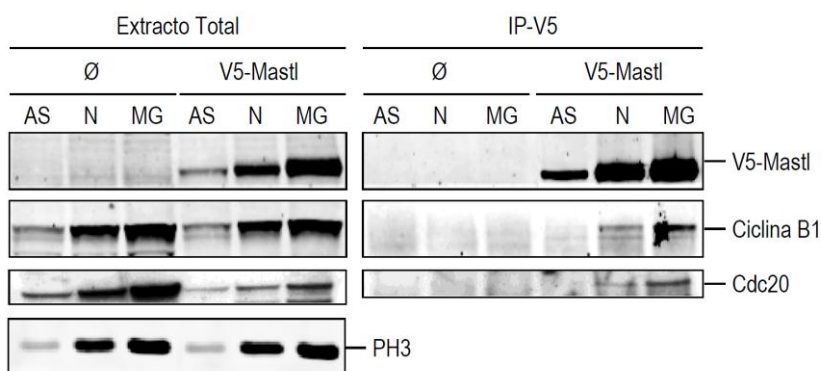


**Figura 41. Mastl no es sustrato ni de APC/C-Cdc20 ni de APC/C-Cdh1.** Ensayo de destrucción dependiente de APC/C-Cdc20 en extractos celulares de *Xenopus laevis*. Las proteínas recombinantes indicadas y marcadas con azufre radioactivo ( $^{35}S$ ) fueron utilizadas como sustratos. Tras la adición de Calcio para activar el complejo APC/C-Cdc20, la ciclina B y la securina fueron degradadas rápidamente, mientras que Aurora B y Mastl mantuvieron niveles estables. Ensayo de destrucción dependiente de APC/C-Cdh1 en extractos celulares de *Xenopus laevis*. Utilizamos los mismos sustratos que en el ensayo anterior. Tras la adición de Fzr1 (Cdh1) y una vez el complejo APC/C-Cdh1 fue activo, todos los sustratos ensayados, excepto Mastl, experimentaron una clara degradación.

Durante la entrada en mitosis, Mastl es fosforilado por Cdk1 lo que favorece su actividad como inhibidor de PP2A-B55 (Castilho et al. 2009; Vigneron et al. 2009). De manera contraria y durante la salida de mitosis, Mastl sufre una importante desfosforilación que sugiere de este proceso su principal mecanismo de inactivación (Burgess et al.). El hecho de que la desfosforilación de Mastl sea su mecanismo esencial de inactivación sugiere la existencia de otra fosfatasa implicada en la activación de PP2A-B55. Tanto nuestros resultados, como recientes trabajos realizados en células embrionarias de *Xenopus laevis*, apuntan a un claro papel de la fosfatasa PP1 en la salida de mitosis. El hecho de que la eliminación del Inhibidor-1 de PP1 resulte en una salida parcial de mitosis, la cual es inhibida por bajas concentraciones de ácido okadaico, sugiere un posible papel de esta fosfatasa en la regulación de la ruta molecular que conforman Mastl y PP2A-B55. La literatura sugiere que la mera inhibición de Cdk1 sería suficiente para promover la completa activación de PP1 (Wu et al. 2009). Así, la inactivación de Cdk1 mediante la degradación de ciclina B facilitaría la activación de PP1, la cual desencadenaría la actividad fosfatasa de PP2A mediante la desfosforilación de Mastl o alguno

de sus sustratos y la consiguiente salida de mitosis. Sin embargo, la infructuosa salida de mitosis observada en las células *Cdc20*( $\Delta/\Delta$ ), tras la inhibición de Cdk1 con roscovitina, no apoya el carácter lineal de esta ruta molecular. La discrepancia entre nuestros resultados y la literatura puede explicarse al menos de dos formas, que la roscovitina no sea lo suficientemente potente para inducir una completa inhibición de Cdk1; o la existencia de otros elementos de control que otorgan un mayor nivel de regulación a esta ruta molecular.

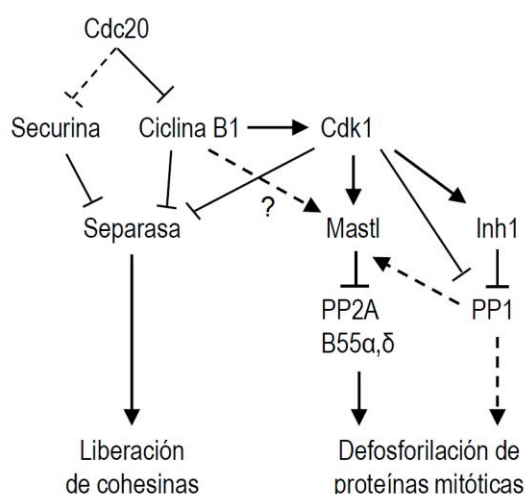
Como anteriormente hemos explicado, la inhibición de separasa es posible mediante la formación del complejo heterotrimérico Cdk1-ciclina B-separasa y la chaperona securina. Si bien la fosforilación de Cdk1 es un paso necesario para la formación de este complejo, la simple inhibición de Cdk1 no es suficiente para inactivar este nivel adicional de regulación. La completa activación de separasa requiere la degradación tanto de ciclina B como de securina (Boos et al. 2008). Como podemos observar en la figura 42, la ciclina B y Mastl co-inmunoprecipitan junto con Cdc20. Este resultado preliminar nos permite elucubrar sobre un posible complejo Cdk1-ciclina B-Mastl, donde la degradación de ciclina B sería un paso necesario para la posterior desfosforilación e inactivación de Mastl. Este modelo propondría por primera vez un papel de la ciclina B independiente de su actividad como regulador positivo de la quinasa Cdk1. De esta manera, la mera inhibición de Cdk1, a pesar de que constituye un proceso indispensable en la salida de mitosis, sería insuficiente para desencadenar este evento debido a la presencia de ciclina B. Aunque este hipotético modelo nos permite encajar todas las piezas del rompecabezas, no dejaría de ser un modelo lineal donde el hecho sustancial lo representaría la degradación de ciclina B, la cual conllevaría la inactivación de Cdk1 y la activación de PP2A-B55.



**Figura 42. Mastl co-inmunoprecipita con ciclina B y Cdc20.** Ensayo de inmunoprecipitación de Mastl. Mastl fusionado a la proteína V5 fue transfectado en células 293 humanas. La inmunoprecipitación de Mastl fue realizada utilizando anticuerpos específicos frente a la proteína V5. Se utilizaron extractos de células paradas en mitosis con

nocodazol (N) o el inhibidor del proteosoma MG132 (MG) y de células asíncronas (AS). Inmunodetección mediante western blot de las proteínas indicadas en los extractos totales o tras la inmunoprecipitación de Mastl.

Dada la posibilidad de que la inhibición química de Cdk1 haya sido completa, nuestros resultados nos impiden descartar un modelo en el que dos rutas moleculares nacientes de la actividad del complejo APC/C-Cdc20, y que serían paralelas e independientes, conduzcan la inactivación de Cdk1 y la activación de PP2A en la salida de mitosis. Este modelo implicaría en último término la existencia de un sustrato de Cdc20 del que su degradación favorecería la activación de PP2A-B55. A pesar de que el inhibidor-1 de PP1 es el miembro más destacado dentro de los 29 inhibidores que se le atribuyen a PP1 en mamíferos, algún otro inhibidor parece también participar en la salida de mitosis. La eliminación de Mypt1 o Ppp1r12a mediante RNAi resulta en la rápida salida de mitosis de células con niveles reducidos de Plk1 (Yamashiro et al. 2008). Estos resultados sugieren un posible papel de esta proteína como regulador de la actividad de PP1 en la salida de mitosis. El hecho de que la proteína Mypt1 contenga varios dominios KEN box y D-Box la convierten en un posible sustrato de Cdc20. En la situación hipotética de que Mypt1 fuera un verdadero sustrato de este cofactor, la proteólisis de este inhibidor podría inducir la actividad de PP1 y finalmente la salida de mitosis. Todo este conjunto de posibilidades y elucubraciones hacen pensar en la salida de mitosis como un intrincado proceso celular donde Cdc20 parece jugar un papel universal (Figura 42).



**Figura 43. Modelo para la salida de mitosis en células de mamíferos.** La activación de separasa tras la degradación de securina y ciclina B por el complejo APC/C-Cdc20 permiten el inicio de anafase. La defosforilación de los sustratos tras la inactivación de Cdk1 sucede como consecuencia de la activación de PP2A-B55α,δ. Así, la inactivación de Mastl mediante su defosforilación constituye un evento esencial en la salida de mitosis.

Atendiendo al título de este apartado, podemos decir que las quinasas Mastl y Cdk1 representan el verdadero talón de Aquiles de Cdc20. Así, mientras la eliminación de Cdc20 conlleva la rápida muerte de las células tumorales, la inhibición concomitante de estas dos quinasas favorece la rápida salida de mitosis y la viabilidad de un importante número de células deficientes para este cofactor. El conocimiento de este importante mecanismo de adaptación podría tener importantes implicaciones en el diseño de futuras drogas cuya estrategia terapéutica este basada en el bloqueo de la salida de mitosis.

Conclusiones





## Conclusiones

1. Cdc20 es un gen esencial durante el desarrollo embrionario de los mamíferos. La eliminación de este cofactor supone la muerte del embrión en el estadio de dos células de desarrollo.
2. Cdc20 es necesario para la activación del complejo APC/C durante la mitosis. La falta de este cofactor es irremplazable y conduce a la parada permanente en metafase en células proliferantes *in vivo*.
3. Cdc20 es requerido para el inicio de la anafase y la proliferación celular tanto en células tumorales como en células progenitoras.
4. La ablación genética de Cdc20 resulta más eficiente que las actuales drogas antimitóticas induciendo muerte celular. Así, mientras los inhibidores mitóticos presentan un efecto limitado en tumores agresivos, la eliminación de Cdc20 resulta en una regresión tumoral completa.
5. La salida de mitosis en las células deficientes para Cdc20 puede ser desencadenada tras la inhibición de las quinasas Mastl y Cdk1. Esta salida es dependiente de la actividad fosfatasa de los complejos PP2A-B55 $\alpha,\delta$ . Esto demuestra la relevancia de la ruta Mastl-PP2A-B55  $\alpha,\delta$  en la regulación de la salida de mitosis en mamíferos.
6. La inhibición de Mastl y Cdk1 incrementa la viabilidad de las células deficientes para el cofactor Cdc20. Este resultado contiene importantes implicaciones terapéuticas en una hipotética estrategia antitumoral basada en la inhibición de Cdc20.



# Bibliografía



- Allan, L. A. and Clarke, P. R. (2007), 'Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis', *Mol Cell*, 26 (2), 301-10.
- Amador, V., et al. (2007), 'APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase', *Mol Cell*, 27 (3), 462-73.
- Andreassen, P. R., et al. (2001), 'Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1', *Mol Biol Cell*, 12 (5), 1315-28.
- Araki, M., Yu, H., and Asano, M. (2005), 'A novel motif governs APC-dependent degradation of Drosophila ORC1 in vivo', *Genes Dev*, 19 (20), 2458-65.
- Bacus, S. S., et al. (2001), 'Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53', *Oncogene*, 20 (2), 147-55.
- Barr, A. R. and Gergely, F. (2007), 'Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles', *J Cell Sci*, 120 (Pt 17), 2987-96.
- Baumgarten, A. J., Felthaus, J., and Wasch, R. (2009), 'Strong inducible knockdown of APC/CCdc20 does not cause mitotic arrest in human somatic cells', *Cell Cycle*, 8 (4), 643-6.
- Bergstrahl, D. T. and Ting, J. P. (2006), 'Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination', *Cancer Treat Rev*, 32 (3), 166-79.
- Blagosklonny, M. V. and Pardee, A. B. (2001), 'Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells', *Cancer Res*, 61 (11), 4301-5.
- Blanco, M. A., et al. (2000), 'APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation', *EMBO J*, 19 (15), 3945-55.
- Bollen, M., Gerlich, D. W., and Lesage, B. (2009), 'Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides', *Trends Cell Biol*, 19 (10), 531-41.
- Booher, R. N., Holman, P. S., and Fattaey, A. (1997), 'Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity', *J Biol Chem*, 272 (35), 22300-6.
- Boos, D., et al. (2008), 'Phosphorylation-dependent binding of cyclin B1 to a Cdc6-like domain of human separase', *J Biol Chem*, 283 (2), 816-23.
- Brandeis, M., et al. (1998), 'Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (8), 4344-9.
- Brito, D. A. and Rieder, C. L. (2006), 'Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint', *Curr Biol*, 16 (12), 1194-200.
- (2009), 'The ability to survive mitosis in the presence of microtubule poisons differs significantly between human nontransformed (RPE-1) and cancer (U2OS, HeLa) cells', *Cell Motil Cytoskeleton*, 66 (8), 437-47.

- Burgess, A., et al. 'Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (28), 12564-9.
- Castedo, M., et al. (2002), 'Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe', *Cell Death Differ*, 9 (12), 1287-93.
- Castilho, P. V., et al. (2009), 'The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites', *Mol Biol Cell*, 20 (22), 4777-89.
- Clarke, D. J. (2009), 'Strong inducible knockdown of Cdc20 does not cause mitotic arrest in human somatic cells: implications for cancer therapy?', *Cell Cycle*, 8 (4), 515-6.
- Chung, E. and Chen, R. H. (2003), 'Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint', *Nat Cell Biol*, 5 (8), 748-53.
- De Boer, L., et al. (2008), 'Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events', *Oncogene*, 27 (31), 4261-8.
- Dephoure, N., et al. (2008), 'A quantitative atlas of mitotic phosphorylation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (31), 10762-7.
- Di Fiore, B. and Pines, J. 'How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint', *J Cell Biol*, 190 (4), 501-9.
- Dobles, M., et al. (2000), 'Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2', *Cell*, 101 (6), 635-45.
- Dutertre, S., et al. (2004), 'Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition', *J Cell Sci*, 117 (Pt 12), 2523-31.
- Eichhorn, P. J., Creighton, M. P., and Bernards, R. (2009), 'Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1795 (1), 1-15.
- Evans, T., et al. (1983), 'Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division', *Cell*, 33 (2), 389-96.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W. (1998), 'Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1', *Mol Cell*, 2 (2), 163-71.
- Felix, M. A., Cohen, P., and Karsenti, E. (1990), 'Cdc2 H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in the *Xenopus* early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid', *EMBO J*, 9 (3), 675-83.
- Frisch, S. M. and Mymryk, J. S. (2002), 'Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (6), 441-52.
- Fry, A. M., Meraldi, P., and Nigg, E. A. (1998), 'A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators', *EMBO J*, 17 (2), 470-81.

- Fu, Z., et al. (2008), 'Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression', *Nat Cell Biol*, 10 (9), 1076-82.
- Fung, T. K. and Poon, R. Y. (2005), 'A roller coaster ride with the mitotic cyclins', *Semin Cell Dev Biol*, 16 (3), 335-42.
- Fung, T. K., Ma, H. T., and Poon, R. Y. (2007), 'Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor', *Mol Biol Cell*, 18 (5), 1861-73.
- Garcia-Higuera, I., et al. (2008), 'Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1', *Nat Cell Biol*, 10 (7), 802-11.
- Gascoigne, K. E. and Taylor, S. S. (2008), 'Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs', *Cancer Cell*, 14 (2), 111-22.
- (2009), 'How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?', *J Cell Sci*, 122 (Pt 15), 2579-85.
- Gautier, J., et al. (1988), 'Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*', *Cell*, 54 (3), 433-9.
- (1990), 'Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus', *Cell*, 60 (3), 487-94.
- Ge, S., Skaar, J. R., and Pagano, M. (2009), 'APC/C- and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation', *Cell Cycle*, 8 (1), 167-71.
- Geley, S., et al. (2001), 'Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint', *J Cell Biol*, 153 (1), 137-48.
- Ghiara, J. B., et al. (1991), 'A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis', *Cell*, 65 (1), 163-74.
- Golan, A., Yudkovsky, Y., and Hershko, A. (2002), 'The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk', *J Biol Chem*, 277 (18), 15552-7.
- Gorr, I. H., Boos, D., and Stemmann, O. (2005), 'Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation', *Mol Cell*, 19 (1), 135-41.
- Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D. O. (1992), 'Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15', *EMBO J*, 11 (11), 3995-4005.
- Guerra, C., et al. (2003), 'Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context', *Cancer Cell*, 4 (2), 111-20.
- Hagting, A., et al. (1999), 'Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal', *Curr Biol*, 9 (13), 680-9.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000), 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100 (1), 57-70.

- Harbour, J. W. and Dean, D. C. (2000), 'The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms', *Genes Dev*, 14 (19), 2393-409.
- Hartwell, L. H. and Weinert, T. A. (1989), 'Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events', *Science*, 246 (4930), 629-34.
- Hartwell, L. H., et al. (1973), 'Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants', *Genetics*, 74 (2), 267-86.
- Herzog, F., et al. (2009), 'Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex', *Science*, 323 (5920), 1477-81.
- Hsu, J. Y., et al. (2000), 'Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes', *Cell*, 102 (3), 279-91.
- Huang, H. C., et al. (2009), 'Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly', *Cancer Cell*, 16 (4), 347-58.
- Ishida, S., et al. (2001), 'Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis', *Mol Cell Biol*, 21 (14), 4684-99.
- Jordan, M. A. and Wilson, L. (2004), 'Microtubules as a target for anticancer drugs', *Nat Rev Cancer*, 4 (4), 253-65.
- Kaelin, W. G., Jr. (1999), 'Functions of the retinoblastoma protein', *Bioessays*, 21 (11), 950-8.
- Kaestner, P. and Bastians, H. 'Mitotic drug targets', *J Cell Biochem*, 111 (2), 258-65.
- Katula, K. S., et al. (1997), 'Cyclin-dependent kinase activation and S-phase induction of the cyclin B1 gene are linked through the CCAAT elements', *Cell Growth Differ*, 8 (7), 811-20.
- King, R. W., et al. (1996), 'How proteolysis drives the cell cycle', *Science*, 274 (5293), 1652-9.
- (1995), 'A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B', *Cell*, 81 (2), 279-88.
- Koyanagi, N., et al. (1994), 'In vivo tumor growth inhibition produced by a novel sulfonamide, E7010, against rodent and human tumors', *Cancer Res*, 54 (7), 1702-6.
- Kramer, E. R., et al. (2000), 'Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1', *Mol Biol Cell*, 11 (5), 1555-69.
- Lane, H. A. and Nigg, E. A. (1996), 'Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes', *J Cell Biol*, 135 (6 Pt 2), 1701-13.
- Lim, H. H., Goh, P. Y., and Surana, U. (1998), 'Cdc20 is essential for the cyclosome-mediated proteolysis of both Pds1 and Clb2 during M phase in budding yeast', *Curr Biol*, 8 (4), 231-4.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R. H. (2009), 'The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network', *J Cell Biol*, 185 (2), 193-202.



Lindqvist, A., et al. (2005), 'Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome', *J Cell Biol*, 171 (1), 35-45.

Littlepage, L. E., et al. (2002), 'Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (24), 15440-5.

Luscher-Firzlaff, J. M., Lilischkis, R., and Luscher, B. (2006), 'Regulation of the transcription factor FOXM1c by Cyclin E/CDK2', *FEBS Lett*, 580 (7), 1716-22.

Malumbres, M. and Pellicer, A. (1998), 'RAS pathways to cell cycle control and cell transformation', *Front Biosci*, 3, d887-912.

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001), 'To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer', *Nat Rev Cancer*, 1 (3), 222-31.

--- (2005), 'Mammalian cyclin-dependent kinases', *Trends Biochem Sci*, 30 (11), 630-41.

Manchado, E., Eguren, M., and Malumbres, M. 'The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions', *Biochem Soc Trans*, 38 (Pt 1), 65-71.

Masui, Y. and Markert, C. L. (1971), 'Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes', *J Exp Zool*, 177 (2), 129-45.

Mei, J., Huang, X., and Zhang, P. (2001), 'Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts', *Curr Biol*, 11 (15), 1197-201.

Mochida, S. and Hunt, T. (2007), 'Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase', *Nature*, 449 (7160), 336-40.

Morgan, D. O. (1995), 'Principles of CDK regulation', *Nature*, 374 (6518), 131-4.

--- (1997), 'Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 261-91.

Murray, A. W. (1993), 'Cell cycle. Sunburnt fission yeast', *Nature*, 363 (6427), 302.

Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007), 'The spindle-assembly checkpoint in space and time', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (5), 379-93.

Nakajima, H., et al. (2003), 'Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate', *J Biol Chem*, 278 (28), 25277-80.

Nakayama, K. I. and Nakayama, K. (2006), 'Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer', *Nat Rev Cancer*, 6 (5), 369-81.

Nasmyth, K. (2005), 'How do so few control so many?', *Cell*, 120 (6), 739-46.

Nasmyth, K. and Haering, C. H. (2009), 'Cohesin: its roles and mechanisms', *Annu Rev Genet*, 43, 525-58.

- Nilsson, J., et al. (2008), 'The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction', *Nat Cell Biol*, 10 (12), 1411-20.
- Norbury, C. and Nurse, P. (1992), 'Animal cell cycles and their control', *Annu Rev Biochem*, 61, 441-70.
- O'Farrell, P. H. (2001), 'Triggering the all-or-nothing switch into mitosis', *Trends Cell Biol*, 11 (12), 512-9.
- Pagano, M. (1997), 'Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway', *FASEB J*, 11 (13), 1067-75.
- Pardee, A. B. (1974), 'A restriction point for control of normal animal cell proliferation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71 (4), 1286-90.
- Perera, D., et al. (2007), 'Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint', *Dev Cell*, 13 (4), 566-79.
- Peters, J. M. (2006), 'The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (9), 644-56.
- Pfleger, C. M. and Kirschner, M. W. (2000), 'The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1', *Genes Dev*, 14 (6), 655-65.
- Polager, S., et al. (2002), 'E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis', *Oncogene*, 21 (3), 437-46.
- Poon, R. Y., et al. (1993), 'The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2', *EMBO J*, 12 (8), 3123-32.
- Potapova, T. A., et al. (2006), 'The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells', *Nature*, 440 (7086), 954-8.
- Queralt, E. and Uhlmann, F. (2008), 'Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit', *Curr Opin Cell Biol*, 20 (6), 661-8.
- Raffaghello, L., et al. (2008), 'Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (24), 8215-20.
- Reddy, S. K., et al. (2007), 'Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation', *Nature*, 446 (7138), 921-5.
- Rieder, C. L. and Maiato, H. (2004), 'Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint', *Dev Cell*, 7 (5), 637-51.
- Rieder, C. L. and Medema, R. H. (2009), 'No way out for tumor cells', *Cancer Cell*, 16 (4), 274-5.
- Robbins, E. and Gonatas, N. K. (1964), 'The Ultrastructure of a Mammalian Cell during the Mitotic Cycle', *J Cell Biol*, 21, 429-63.
- Rudner, A. D. and Murray, A. W. (2000), 'Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex', *J Cell Biol*, 149 (7), 1377-90.

Ruzankina, Y., et al. (2007), 'Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss', *Cell Stem Cell*, 1 (1), 113-26.

Schmitz, M. H., et al. 'Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells', *Nat Cell Biol*, 12 (9), 886-93.

Shen, S. C., et al. (1998), 'Taxol-induced p34cdc2 kinase activation and apoptosis inhibited by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human breast MCF-7 carcinoma cells', *Cell Growth Differ*, 9 (1), 23-9.

Shi, J., Orth, J. D., and Mitchison, T. (2008), 'Cell type variation in responses to antimitotic drugs that target microtubules and kinesin-5', *Cancer Res*, 68 (9), 3269-76.

Shirayama, M., et al. (1999), 'APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5', *Nature*, 402 (6758), 203-7.

Sigrist, S., et al. (1995), 'Exit from mitosis is regulated by Drosophila fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3', *EMBO J*, 14 (19), 4827-38.

Sigrist, S. J. and Lehner, C. F. (1997), 'Drosophila fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles', *Cell*, 90 (4), 671-81.

Skoufias, D. A., et al. (2007), 'Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed', *J Cell Biol*, 179 (4), 671-85.

Steehmaier, M., et al. (2007), 'BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo', *Curr Biol*, 17 (4), 316-22.

Stegmeier, F., et al. (2007), 'Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities', *Nature*, 446 (7138), 876-81.

Stemmann, O., et al. (2001), 'Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase', *Cell*, 107 (6), 715-26.

Sudakin, V. and Yen, T. J. (2007), 'Targeting mitosis for anti-cancer therapy', *BioDrugs*, 21 (4), 225-33.

Sudakin, V., et al. (1995), 'The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis', *Mol Biol Cell*, 6 (2), 185-97.

Sudo, T., et al. (2004), 'Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint', *Cancer Res*, 64 (7), 2502-8.

Sullivan, M. and Morgan, D. O. (2007), 'Finishing mitosis, one step at a time', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (11), 894-903.

Takizawa, C. G. and Morgan, D. O. (2000), 'Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C', *Curr Opin Cell Biol*, 12 (6), 658-65.

Tao, W., et al. (2005), 'Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage', *Cancer Cell*, 8 (1), 49-59.

- Thornton, B. R. and Toczyski, D. P. (2003), 'Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC', *Nat Cell Biol*, 5 (12), 1090-4.
- (2006), 'Precise destruction: an emerging picture of the APC', *Genes Dev*, 20 (22), 3069-78.
- Townesley, F. M. and Ruderman, J. V. (1998), 'Proteolytic ratchets that control progression through mitosis', *Trends Cell Biol*, 8 (6), 238-44.
- Toyoshima-Morimoto, F., et al. (2001), 'Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase', *Nature*, 410 (6825), 215-20.
- Varetti, G. and Musacchio, A. (2008), 'The spindle assembly checkpoint', *Curr Biol*, 18 (14), R591-5.
- Vigneron, S., et al. (2009), 'Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A', *EMBO J*, 28 (18), 2786-93.
- Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997), 'CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis', *Science*, 278 (5337), 460-3.
- Visintin, R., et al. (1998), 'The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation', *Mol Cell*, 2 (6), 709-18.
- Wang, Q., et al. (2004), 'BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis', *Blood*, 103 (4), 1278-85.
- Watanabe, N., et al. (2004), 'M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (13), 4419-24.
- Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. (2005), 'Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death', *Cancer Cell*, 8 (1), 7-12.
- Weitzer, S. and Uhlmann, F. (2002), 'Chromosome segregation: playing polo in prophase', *Dev Cell*, 2 (4), 381-2.
- Wigler, M., et al. (1977), 'Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells', *Cell*, 11 (1), 223-32.
- Wirth, K. G., et al. (2006), 'Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression', *J Cell Biol*, 172 (6), 847-60.
- Wolthuis, R., et al. (2008), 'Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A', *Mol Cell*, 30 (3), 290-302.
- Wu, J. Q., et al. (2009), 'PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation', *Nat Cell Biol*, 11 (5), 644-51.
- Yamamoto, A., Guacci, V., and Koshland, D. (1996), 'Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*', *J Cell Biol*, 133 (1), 85-97.
- Yamano, H., Gannon, J., and Hunt, T. (1996), 'The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*', *EMBO J*, 15 (19), 5268-79.

- Yamashiro, S., et al. (2008), 'Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1', *Dev Cell*, 14 (5), 787-97.
- Zachariae, W., et al. (1998a), 'Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex', *Science*, 282 (5394), 1721-4.
- (1998b), 'Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins', *Science*, 279 (5354), 1216-9.
- Zeng, X., et al. 'Pharmacologic inhibition of the anaphase-promoting complex induces a spindle checkpoint-dependent mitotic arrest in the absence of spindle damage', *Cancer Cell*, 18 (4), 382-95.
- Ziebold, U., et al. (1997), 'Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2', *Curr Biol*, 7 (4), 253-60.
- Zou, H., et al. (1999), 'Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis', *Science*, 285 (5426), 418-22.
- Zur, A. and Brandeis, M. (2001), 'Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis', *EMBO J*, 20 (4), 792-801.



Anexos